



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i biologia molecular
Programa de doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Tesi doctoral

Estudi de la composició de la quasiespècies del virus de la hepatitis B a les regions codificants de les proteïnes de l'envolta i la polimerasa viral per seqüenciació massiva: associació de les seves variants genètiques amb el tractament antiviral de la hepatitis B crònica amb anàlegs de nucleòsids/nucleòtids

Autor de la tesi

David Tabernero Caellas

Directors de la tesi

Dr. Francisco Rodríguez Frías

Dra. Maria Buti Ferret

Tutora de la tesi

Dra. Anna Messeguer Navarro

Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 2015

ESTUDIS

3. PRIMER ESTUDI: ULTRA-DEEP PYROSEQUENCING DETECTS CONSERVED GENOMIC SITES AND QUANTIFIES LINKAGE OF DRUG-RESISTANT AMINO ACID CHANGES IN THE HEPATITIS B VIRUS GENOME

3.1. INTRODUCCIÓ:

Actualment les opcions de tractament contra l'hepatitis B crònica (HBC) més àmpliament utilitzades són els tractaments de la família dels anàlegs de nucleòtids o nucleòsids (NUCs) (principalment lamivudina: LAM, adefovir: ADV, entecavir: ETV; tenofovir: TDF). A pesar d'impedir la retrotranscripció de l'ARN pregenòmic (pgARN), els NUCs no eviten la formació ni la persistència de l'ADN circular covalentment tancat (cccADN) al nucli dels hepatòcits infectats (300,301) i per tant l'aclariment del cccADN es produeix de manera lenta (506,509,517,594). A causa d'això hi ha una alta probabilitat de reactivació de la replicació viral en retirar els NUCs, per tant s'han d'administrar durant un període de temps llarg per mantenir la supressió sostinguda de la replicació viral o resposta virològica sostinguda (RVS), potencialment tota la vida del pacient. El tractament a llarg termini amb NUCs pot causar la selecció de variants genètiques del virus de l'hepatitis B (VHB) resistents o amb baixa sensibilitat a l'acció de determinats NUCs, que en absència de tractament antiviral estan en proporcions minoritàries dins la quasiespècies. Aquestes variants donaran lloc a augments de la càrrega viral del VHB (és a dir, els títols sèrics d'ADN del VHB) i poden donar lloc a exacerbacions de la malaltia hepàtica (523–527) [veure 2.5.1. Resistència al tractament antiviral amb anàlegs de nucleòsids i nucleòtids (NUCs)]. Això passa sobretot en el cas de LAM, associat a una elevada probabilitat de seleccionar variants resistents (baixa barrera genètica) (484). Tot i que avui en dia LAM no és una opció de tractament recomanada per les principals guies clíniques de tractament de la HBC, encara s'utilitza en algunes regions del món pel seu baix cost econòmic (530). Per exemple a la Xina, (93 milions de pacients amb HBC a l'any 2010) (595) l'ús de LAM i ADV és comú, principalment per motius econòmics. A més LAM va ser el primer tractament de la família dels NUCs utilitzat en la HBC i molts dels pacients l'han rebut en algun moment (459,512) i han seleccionat variants genètiques resistents a la seva acció. Això complica el tractament antiviral perquè la replicació d'aquestes variants fa que aquestes infectin noves cèl·lules i s'emmagatzemin en el seu nucli mitjançant el cccADN, amb la qual cosa es podran seleccionar de nou ràpidament en tornar a administrar un tractament basat en NUCs pels que puguin tenir sensibilitat reduïda (529,545–547) (resistència creuada, veure 2.5.1.4. Resistències creuades).

Degut a l'organització genòmica del VHB, la pauta oberta de lectura (ORF) de la polimerasa viral (P) es solapa amb l'ORF de les proteïnes de superfície del VHB (S) (veure 2.1.2.1. Les pautes obertes de lectura i proteïnes virals), per tant les variants seleccionades mitjançant el tractament antiviral amb NUCs també poden presentar al mateix temps alteracions en epítops importants codificats a l'ORF S, que modifiquen l'antigenicitat de l'antigen de superfície del VHB (HBsAg) amb la qual cosa poden disminuir els efectes protectors de les immunoglobulines contra el VHB (HBIg) o de la vacuna (437,596), i pot causar resultats falsos negatius en alguns assaigs de serologia per HBsAg (597).

A pesar de la rellevància en l'efectivitat del tractament amb NUCs de les variants genètiques resistents que es troben en proporcions minoritàries a la quasiespècies del VHB, la seva determinació es basa en tècniques que només són capaces de detectar canvis d'aminoàcid (aa) en posicions concretes del genoma del VHB amb nivells de sensibilitat relativament baixos, fonamentalment seqüenciació directa del genoma del VHB pel mètode de Sanger [nivell de sensibilitat aproximadament 20% de la quasiespècies del VHB (459), veure 2.3.4.3. Tècniques genotípiques basades en seqüenciació directa d'amplicons o amb un pas previ de clonatge molecular] i hibridació reversa (INNO-LiPA) [nivell de sensibilitat aproximadament 5-10% (459), veure 2.3.4.1. Tècniques genotípiques basades en hibridació]. Per tal de quantificar les freqüències de cada substitució d'aa i determinar si estan combinades en el mateix genoma, es pot realitzar mitjançant la seqüenciació directa pel mètode de Sanger amb un pas previ de clonatge molecular, però aquesta metodologia molt laboriosa i el nombre de genomes que es pot analitzar és relativament baix per representar una mostra significativa de les variants genètiques de la quasiespècies viral. Les tècniques de seqüenciació massiva, en canvi, permeten analitzar de manera clonal i en paral·lel la seqüència de milers de molècules d'ADN (454,598), per tant milloren molt la sensibilitat de les tècniques clàssiques per analitzar la composició de variants i complexitat de les quasiespècies del VHB, i a més permeten analitzar genomes de VHB individuals sense passos previs de clonatge molecular (veure 2.3.4.4. Tècniques de seqüenciació massiva).

3.2. HIPÒTESI I OBJECTIUS:

3.2.1. Hipòtesis:

1. L'anàlisi de la quasiespècies viral en absència de tractament antiviral podria identificar posicions conservades en el domini transcriptasa reversa (RT), amb un paper potencialment essencial en la polimerasa viral. A més l'anàlisi del domini RT també serà útil per establir si

el percentatge de variants resistents al tractament antiviral en la quasiespècies basal (en absència de tractament antiviral o després de la fallada d'un determinat NUC) podria predir la seva posterior selecció per un tractament determinat.

2. La dinàmica de la quasiespècies deguda al tractament antiviral amb NUCs, amb selecció de variants que presenten canvis a la regió on estan solapades les seqüències codificants dels dominis RT de la polimerasa viral i les proteïnes de superfície, podria enriquir la quasiespècies del VHB en variants amb canvis en les regions epitòpiques del HBsAg. Aquestes podrien afectar la formació, estabilitat i infectivitat de les partícules virals, així com el reconeixement del HBsAg pel sistema immunitari.

3.2.2. Objectius:

1. Establir una metodologia que permeti estudiar per seqüenciació massiva la composició de variants genètiques en pretractament i durant el tractament seqüencial amb NUCs en la regió seleccionada.
2. Estudiar la influència dels canvis d'aa seleccionats durant el tractament amb NUCs sobre l'ORF S.
3. Avaluar els canvis d'aa que succeeixen simultàniament en el mateix genoma (anàlisi de lligament o "linkage analysis") durant el tractament seqüencial amb NUCs.

3.3. RESUM DE L'ESTUDI:

En aquest estudi s'han obtingut vuit mostres de sèrum de quatre pacients amb HBC de característiques virològiques i de tractament similars:

- Genotip A i subgenotip A2 amb antígen e del VHB (HBeAg) positiu.
- Tots ells van rebre LAM com a primer tractament antiviral de la família dels NUCs.
- La seva mostra basal no presentava variants associades a la resistència a NUCs tant per LiPA com per seqüenciació directa, i durant el seu seguiment cap d'ells va seleccionar variants resistents a NUCs fora dels dominis funcionals B i C de RT.
- Cap d'ells presentava coinfeccions per virus de l'hepatitis C i D (VHC i VHD) ni Virus de la immunodeficiència humana (VIH).

Aquestes condicions són importants tant per facilitar la comparació de les quasiespècies d'aquests pacients com per seleccionar la regió del domini RT més rellevant pel seu estudi per seqüenciació massiva.

Els canvis d'aa que donen lloc a la resistència al tractament antiviral amb NUCs poden estar separats per varies posicions dins la seqüència del domini RT. Per tal de detectar el lligament d'aquests canvis en una mateixa variant de la quasiespècies del VHB cal que estiguin agrupats en una mateixa seqüència [un mateix fragment amplificat per reacció en cadena de la polimerasa (PCR), és dir un amplicó]. Per això es va escollir la tecnologia de seqüenciació massiva que permetia analitzar fragments d'ADN més llargs entre les disponibles en el moment de realitzar aquest estudi, la "Ultra-deep pyrosequencing" (UDPS) (454), en la plataforma GS-FLX (Roche) que llavors permetia analitzar fragments de fins a 250 parells de bases (pb) (més tard es va ampliar la longitud dels fragments a 400 pb, com es veurà en el següent estudi). Així doncs, es va decidir analitzar un fragment entre els nucleòtids (nt) 571-755 respecte la diana única d'Eco RI del genoma del VHB (59) (aa rt148-rt208 a l'ORF P i s140-s200 en l'ORF S, veure figura 1 de l'article a l'annex 1), que codifica els dominis funcionals B i C del RT on es van seleccionar els canvis d'aa rellevants per la resistència al tractament antiviral dels pacients seleccionats. Al mateix temps, en l'ORF S inclou algunes de les posicions més importants del determinant "a" com sK141 [que posteriorment a aquest estudi es va relacionar amb la infectivitat del VHB (147)], sG145 [principal posició relacionada amb l'escapament a la vacunació antiviral (175)] i sN146 [punt de N-glicosilació comú a totes les proteïnes de superfície (26)], així com epítops de limfòcits T (599).

Les vuit mostres de sèrum analitzades per UDPS corresponen a la mostra obtinguda abans del tractament amb LAM de tots quatre (denominades a l'article 1, 2, 3 i 4A). Un d'aquests pacients, a més, va rebre tractament seqüencial amb LAM (mostra 4C), ADV (mostra 4D) i ETV (mostra 4E) i es va analitzar una mostra al final de cada un d'aquests tractaments, per tal d'estudiar la quasiespècies basal i al final de cada període de tractament. A més, d'aquest pacient també es va analitzar una mostra obtinguda 42 mesos després de la 4A, just abans de començar el tractament amb LAM (mostra 4B) per tal d'estudiar també l'evolució de la quasiespècies del VHB en la regió estudiada, sense la pressió selectiva del tractament antiviral.

3.3.1. Filtratge i validació de les dades obtingudes per UDPS:

A pesar dels seus avantatges les tècniques de seqüenciació massiva generen seqüències artefactuals en proporcions relativament altes, perquè tant l'amplificació per PCR com la

seqüenciació massiva són processos que tendeixen a introduir errors en les seqüències de nt (469,591,600). Per això, un cop obtingudes les seqüències (també anomenades lectures o “reads” en el context de la seqüenciació massiva) cal un processament bioinformàtic per eliminar aquells que tinguin uns nivells de qualitat baixos o possibles canvis a la seva seqüència introduïts per la PCR o el procediment de seqüenciació, i preparar-los pel seu alineament i anàlisi. Aquest primer pas per l’anàlisi dels “reads” s’ha realitzat mitjançant un sistema de filtratge bioinformàtic, desenvolupat per la Unitat d’Estadística i Bioinformàtica del Vall d’Hebrón Institut de Recerca i basat en l’entorn de programació de codi obert R (601). El doctorand no ha intervingut directament en el procés de disseny informàtic però sí en la fase de triatge de regions, condicions i validació a nivell biològic de les dades que es van anar obtenint durant la validació final de l’algoritme. Per aquets motius no s’inclou aquí una explicació detallada de l’algoritme que tan sols es comenta breument:

1. En primer lloc, en aquest estudi s’ha dividit dos plaques “PicoTiter” del seqüenciador GS-FLX en quatre porcions, en cada una de les quals s’ha carregat una mostra. Cada una d’aquestes porcions genera un fitxer en format fasta¹ diferent, d’aquesta manera, les seqüències obtingudes (“reads”) de cada mostra són separats en fitxers diferents segons la porció de cada placa d’on proveniu.
2. En cada un dels fitxers fasta obtinguts al final del procediment d’UDPS, s’han separat les seqüències dels “reads” obtinguts a partir de les cadenes directa i reversa de cada amplicó segons la seqüència dels primers utilitzats (HBVRTfw i HBVRTrv), de manera que s’agrupen en el mateix fitxer els “reads” obtinguts de cada una de les cadenes dels amplicons generats a partir de cada mostra. Així, els 16 fitxers generats (dos per cada una de les vuit mostres analitzades en els dos experiments d’UDPS) han estat utilitzats com a dades d’entrada pel programa R. Durant aquest procés s’han eliminat tots els “reads” amb errors en més del 25 % dels primers 20 nt de la seqüència dels encebadors (“primers”) (592) que hauria de ser sempre la mateixa, independentment de la resta de l’amplicó. Això s’ha fet per tal d’eliminar “reads” que acumulin molts errors. Cal tenir en compte que els errors de seqüenciació són més probables als extrems de les seqüències, on es localitzen els primers, fet observat amb clons, i per això aquest grau de tolerància es va pensar que no esbiaixaria significativament els canvis localitzats a l’interior de les seqüències. A més la síntesi química dels primers no està exempta d’errors i per això no es podia exigir l’absència total d’errors.
3. A continuació s’analitza la distribució de les longituds dels “reads” i es selecciona un valor de longitud com a punt de tall, tenint en compte que ha de ser suficient per arribar fins a la

¹ El format FASTA és un format de fitxer en text per a la representació de seqüències tant de nt com d’aa, en què aquests es representen utilitzant un codi d’una sola lletra. Aquest format també permet que les seqüències estiguin encapçalades pel nom de la seqüència o comentaris (641).

seqüència del “primer” de la seva seqüència complementaria i que fos un valor on la majoria dels “reads” obtinguts arribessin. D’aquesta manera s’eliminen tots els “reads” significativament curts, que no cobreixen tota la seqüència a analitzar, alhora que es talla a partir d’aquest llindar en tots els “reads” que el sobrepassin (592). D’aquesta manera tots els “reads” del mateix fitxer queden amb la mateixa longitud.

4. En tots els “reads” s’elimina la seqüència dels “primers”, de manera que només queda la seqüència codificant dels aa rt148-rt208 a l’ORF P i s140-s200 en l’ORF S.
5. S’eliminen els “reads” que continguin indeterminacions (que són una proporció baixa del total obtingut) (592).
6. Els “reads” obtinguts de les seqüències reverses (“reverse”) són transformats en la seqüència directa (“forward”) per poder estudiar-se tots junts. En aquest estudi s’ha decidit sumar els “reads” “reverse” als “forward”, però no s’ha exigint les seqüències obtingudes en cada un dels dos tipus de “reads” fossin les mateixes i en proporcions similars.
7. S’eliminen els “reads” que contenen insercions o delecions a partir d’un alineament global amb la seqüència màster (592).

Per tal de detectar variants genètiques minoritàries presents en proporcions el més baixes possible a la quasiespècies del VHB, s’ha tingut en compte el nombre de genomes virals independents presents a la mostra analitzada, és a dir la càrrega viral de les mostres de sèrum, i el nombre de “reads” de cada nt que s’ha obtingut en cada mostra, és a dir la cobertura (600). A més, partint d’observacions realitzades en estudis previs (602) es va assumir que la sensibilitat amb la que es poden detectar substitucions de nt en un amplicó amb un nivell de fiabilitat acceptable esta limitada per la incorporació errònia de nt en els amplicons que formaran les biblioteques que es sotmetran a UDPS. Així, en aquest estudi:

- Per tal de partir d’un nombre elevat de genomes virals en els que poguessin estar representades el màxim de poblacions virals possibles les vuit mostres seleccionades per aquest estudi tenien nivells de càrrega viral elevats ($>10^5$ UI/mL).
- La cobertura obtinguda per cada mostra ha estat relativament elevada: entre 13.670 i 62.450 “reads” per mostra.
- Finalment s’ha intentat minimitzar la incorporació errònia de nt en els amplicons utilitzant una polimerasa d’alta fidelitat en totes les amplificacions [Pfu Turbo, Agilent Technologies, USA, la qual té una taxa d’error de un de cada 1,3 milions de pb segons la informació proporcionada pel fabricant (603)].

Tot i aquestes mesures calia acotar el rang d’error del sistema per poder eliminar els “reads” amb una probabilitat més elevada de ser artefactes del sistema d’amplificació/seqüenciació. Amb aquest objectiu, tal com s’havia fet en estudis de quasiespècies virals anteriors a aquest

(591,600), es va establir un control dels errors del sistema que consistia en processar per triplicat un clon que contingués la regió analitzada per UDPS, la seqüència de la qual s'havia establert per seqüenciació directa pel mètode de Sanger. Es va assumir que totes les molècules d'ADN del clon eren iguals i per tant qualsevol diferència que s'observés en els "reads" obtinguts al final del seu anàlisi era un error del sistema. Per altra banda, s'ha descrit que l'error comés per la tecnologia basada en UDPS depèn del tipus de seqüència, de manera que és superior en homopolímers, repeticions de tres o més nt flanquejats per altres nt no idèntics a ells (473). A més, també es va observar que les taxes d'error variaven segons el canvi de nt que es produeixi. Tenint en compte aquests dos factors, a partir de les freqüències observades de cada tipus de canvi de nt (A:C, A:T, A:G, C:A, C:T, C:G, T:A, T:C, T:G, G:A, G:C, G:T) en cada un dels triplicats i depenent del tipus de regió on es produeix (homopolimèrica o no homopolimèrica) es van construir dos matrius amb les freqüències esperades de cada canvi de nt en cada tipus de regió (veure la taula 7 de l'article a l'annex 1). La distribució de les incorporacions errònies de nt en el sistema d'UDPS es va aproximar a una distribució de Poisson (600) amb paràmetres λ_{ij} (ij correspon a la probabilitat que el nt i de la seqüència màster sigui substituït per un altre nt j , segons si la substitució passa en una zona homopolimèrica o no). Així, posició a posició, si N és el nombre total de "reads" cal determinar si un canvi de nt present en un nombre n d'aquests "reads" és erroni o no. Per això es va calcular la probabilitat que aquesta variant tingués lloc n o més vegades si fos un error generat "in vitro" utilitzant la fórmula de Poisson explicada a la taula 7 de l'article (veure annex 1).

Després d'aplicar la fórmula de Poisson, els "reads" amb una baixa probabilitat de contenir canvis artefactuals ($P < 0,05$) es van incloure a l'anàlisi, mentre que aquells en els que es va obtenir $P \geq 0,05$ en alguna posició van ser descartats, per no poder assegurar que la variant que representaven fos deguda a algun error del procés. Aquest filtre estadístic es va validar i es va establir el llindar de la sensibilitat de tot el sistema mitjançant un clon que contenia la regió del genoma del VHB analitzada en les mostres dels pacients. Aquest clon va ser processat juntament amb les mostres dels pacients i la taxa d'error màxim ("reads" amb substitucions de nt respecte la seqüència del clon determinada per seqüenciació directa) va ser entre el 0,02 i el 0,03% en quatre posicions. Per tant i en global, la proporció en la quasiespècies del VHB a partir de la que una substitució de nt no s'ha considerat un artefacte del sistema és el 0,03%, tot i que en l'estudi s'han considerat només les variants en proporcions per sobre del 0,1% de la quasiespècies, per tal de facilitar la interpretació dels resultats i focalitzar l'atenció en les variants més rellevants de la quasiespècies.

Després de l'anàlisi de les variants del VHB per UDPS, en la mostra obtinguda després de la fallada del tractament amb ETV (4E) es va observar que la quasiespècies estava molt enriquida

en variants que acumulaven varis canvis d'aa associats a la resistència a ETV i LAM: rt180M-202G-204V-207I (72,4%), rt169T-173L-180M-204V (10%) i rt169T-173L-180M-202G-204V-207I (4,6%). Per tal de validar aquests resultats i alhora comparar el sistema d'anàlisi de quasiespècies viral descrit fins ara amb el de referència en el moment de l'estudi, es va analitzar la mostra 4E per clonatge molecular (taula 4). Les variants detectades per clonatge també es van detectar per UDPS i les dues variants detectades amb una proporció més elevada per UDPS van coincidir amb les detectades en proporcions més elevades per clonatge. Així doncs es va validar l'existència de variants que acumulen múltiples canvis d'aa relacionats amb la resistència a NUCs en el seu genoma després del tractament amb ETV, i també l'algoritme utilitzat per l'anàlisi de les quasiespècies virals per UDPS.

Variant	Freqüència UDPS (23249 seqüències)	Freqüència Clonatge (23 seqüències)
rt180M-rt202G-rt204V-rt207I	72,4%	65%
rt169T-rt173L-rt180M-rt204V	10%	22%
rt180M-rt204V	3,2%	13%

Taula 4: Variants detectades per clonatge en la mostra obtinguda després de la fallada del tractament amb ETV (mostra 4E). Es mostren les freqüències en la quasiespècies viral obtingudes per “Ultra-deep pyrosequencing” (UDPS) i per clonatge.

Dels 350.744 “reads” obtinguts de les vuit mostres de sèrum incloses en aquest estudi 245.565 van ser validats pels filtres bioinformàtics.

3.3.2. Anàlisi de les mostres pretractament:

S'han validat 141.581 “reads” corresponents a les mostres dels quatre pacients obtingudes abans del tractament amb LAM. Cada un d'aquests “reads” s'ha alineat contra la seqüència més representada a la mostra a la que corresponia (la seqüència màster, taula 5) per tal de calcular la freqüència de cada canvi d'aa en relació a aquesta seqüència .

Mostra	Màster nucleòtids	Màster ORF P	Màster ORF S
1	TACAAAACCTACGGATGGAAATTGCAC CTGTATTCCCATCCCATCGTCCTGGGC TTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTC AGCTATATGGATGATGTGGTA	YKTYGWKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL LAQFTSAICSVVRRAF PHCLAFSYMDDVV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAYLWEWASVRFS WLSLLVPFVQWFVGLS PTVWLSAIWMMW
2	CACAAAACCTACGGACGGAAATTGCAC CTGTATTCCCATCCCATCGTCCTGGGC TTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTC AGTTATATGGATGATGTGGTA	HKTYGRKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL LAQFTSAICSVVRRAF PHCLAFSYMDDVV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAYLWEWASVRFS WLSLLVPFVQWFVGLS PTVWLSVIWMMW
3	TACAAAACCTACGGATGGAAATTGCAC CTGTATTCCCATCCCATCGTCCTGGGC TTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTC AGCTATATGGATGATGTGGTA	YKTYGWKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL LAQFTSAICSVVRRAF PHCLAFSYMDDVV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAYLWEWASVRFS WLSLLVPFVQWFVGLS PTVWLSAIWMMW
4A	TACAAAACCTACGGACGGAAATTGCAC CTGTATTCCCATCCCATCGTCCTGGGC TTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTC AGCTATATGGATGATGTGGTA	YKTYGRKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL LAQFTSAICSVVRRAF PHCLAFSYMDDVV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAYLWEWASVRFS WLSLLVPFVQWFVGLS PTVWLSAIWMMW

Taula 5: Seqüències més representades (màster) obtingudes en cada una de les quatre mostres de pretractament (1, 2, 3 i 4A corresponents als pacients 1, 2, 3 i 4 respectivament). Es mostra la seqüència de nucleòtids i la seva traducció a aminoàcids en els ORFs P i S. Aquestes seqüències s'han inclòs a l'article com a material suplementari dins els "datasets" S1 (alineament de les seqüències de nucleòtids), S2 (alineament de les seqüències d'aminoàcids en l'ORF P) i S3 (alineament de les seqüències d'aminoàcids en l'ORF S).

Variabilitat i conservació a l'ORF P: En pretractament, a l'ORF P, quatre dels 13 canvis d'aa amb freqüències promig > 0,1% de la quasiespècies del VHB estaven relacionats amb la resistència a NUCs (taula 6), però les seves freqüències no eren significativament diferents a les dels altres canvis d'aa (veure la taula 1 de l'article a l'annex 1) cosa que indica que no hi ha una pressió selectiva específica en favor d'aquests canvis i les seves freqüències es deuen a la

dinàmica natural de les variants de la quasiespècies del VHB. En general, les freqüències d'aquests quatre canvis d'aa no semblaven estar relacionades amb els canvis que es van detectar en cada pacient per hibridació reversa (LiPA) o seqüenciació directa després del tractament amb LAM (veure la taula 2 de l'article a l'annex 1). En aquestes mostres tampoc es van detectar variants amb combinacions de varis canvis d'aa.

En aquest ORF també s'ha valorat la conservació de cada codó, a través de la freqüència dels canvis de nt sinònims (ds, canvis que no impliquen un canvi d'aa) i no sinònims (dn, canvis que impliquen un canvi d'aa). Aquest anàlisi va mostrar 16 codons amb $dn \leq 0,1\%$ i el més conservat d'ells és el que codifica l'aa rtL155, que experimenta molt pocs canvis de nt no sinònims (taula 7). Com s'indica a la figura 2 de l'article (veure a l'annex 1), la freqüència de canvis d'aa en aquesta posició és visiblement més baixa que en la resta, inclús durant el tractament seqüencial. En un model estructural del domini RT de la polimerasa publicat prèviament (604), es va situar aquest residu de leucina a la superfície externa de la RT (figura 40). Donat el caràcter hidròfob d'aquest aa s'especula que podria intervenir en interaccions proteïna-proteïna. Sorprenentment, els codons que codifiquen els àcids aspàrtics essencials del motiu YMDD del centre actiu del domini RT (rtD205 i rtD206) (537) no estaven entre aquests 16 més conservats. Els canvis en aquests residus donen lloc a variants potencialment defectives per la replicació viral. Tanmateix, estudis previs han demostrat que el canvi rtD205H pot ser trans-complementat "in vitro" per una variant "wild-type" (86).

Codó	RT Canvi aa	Pacient (Mostra)				Mitjana de freqüències
		1 N=32.737	2 N=13.670	3 N=62.450	4 (4A) N=32.724	
150	T150A	0.113	0.161	0.090	0.037	0.100
157	L157M	0.009	0.168	0.042	0.186	0.101
163	V163A	0.110	0.154	0.141	0.055	0.115
166	F166L	0.125	0.198	0.122	0.046	0.123
178	F178L	0.116	0.161	0.118	0.070	0.116
181	A181T	0.073	0.176	0.070	0.089	0.102
187	I187L	0.046	5.026	0.006	0.028	1.276
191	V191I	0.107	0.080	0.131	0.590	0.227
194	A194T	0.067	0.241	0.074	0.067	0.112
199	L199V	0.021	3.980	0.003	0.009	1.003
204	M204I	0.067	0.351	0.086	0.079	0.146
205	D205N	0.082	0.256	0.054	0.046	0.110
207	V207M	0.116	0.124	0.107	0.128	0.119

Taula 6: Canvis d'aminoàcid amb una freqüència promig > 0,1% en l'ORF P de cada una de les quatre mostres de pretractament (1, 2, 3 i 4A corresponents als pacients 1, 2, 3 i 4 respectivament). La freqüència

del canvi d'aminoàcid en cada mostra s'ha marcat en negreta si és >0,1% i en gris si és <0,03%. Aquesta taula s'ha obtingut a partir de la taula suplementària S1 de l'article. (RT=domini RT de la polimerasa del VHB, aa= aminoàcid, N=nombre de lectures de seqüència o "reads" per mostra). El canvi observat al codó rt181 a la mostra 4A va ser seleccionat pel tractament antiviral i va ser el responsable del fracàs dels tractaments amb lamivudina i adefovir del pacient 4. Els demés pacients no van ser estudiats per UDPS durant els tractaments antivirals posteriors, però els resultats obtinguts per LiPA i seqüenciació directa no confirmen la selecció posterior dels canvis representats en freqüències més altes (taula 2 de l'article, veure annex 1).

Residu del domini RT	(%) Canvis nt totals	(%) dn	<i>dn/ds</i>
Y151	0,18	0,10	<i>1,22</i>
L155	0,14	0,02	<i>0,16</i>
Y158	0,12	0,05	<i>0,67</i>
K168	0,10	0,07	<i>2,72</i>
I169	0,48	0,10	<i>0,27</i>
P170	0,14	0,08	<i>1,50</i>
S176	0,22	0,09	<i>0,67</i>
P177	0,19	0,10	<i>1,21</i>
L180	0,24	0,07	<i>0,41</i>
Q182	0,17	0,06	<i>0,61</i>
C188	0,18	0,07	<i>0,69</i>
F195	0,13	0,08	<i>1,62</i>
P196	0,16	0,10	<i>1,86</i>
F201	0,18	0,09	<i>0,94</i>
S202	0,19	0,10	<i>1,14</i>
Y203	0,11	0,06	<i>1,10</i>

Taula 7: Conservació dels nucleòtids als codons de l'ORF P. Es mostra per cada codó la freqüència de canvis de nucleòtid (nt) totals, la freqüència dels que impliquen un canvi d'aminoàcid (no sinònims, dn) i la relació entre els canvis no sinònims i sinònims (ds), els quals no impliquen un canvi d'aminoàcid (dn/ds). La relació dn/ds indica quin tipus de canvis de nt sol afectar al codó, cosa que estima la pressió evolutiva sobre ell. Aquesta taula s'ha obtingut a partir de la taula suplementària S2 de l'article. Crida l'atenció la baixa proporció de canvis no sinònims de rtL155. (RT=domini transcriptasa reversa de la polimerasa del VHB).

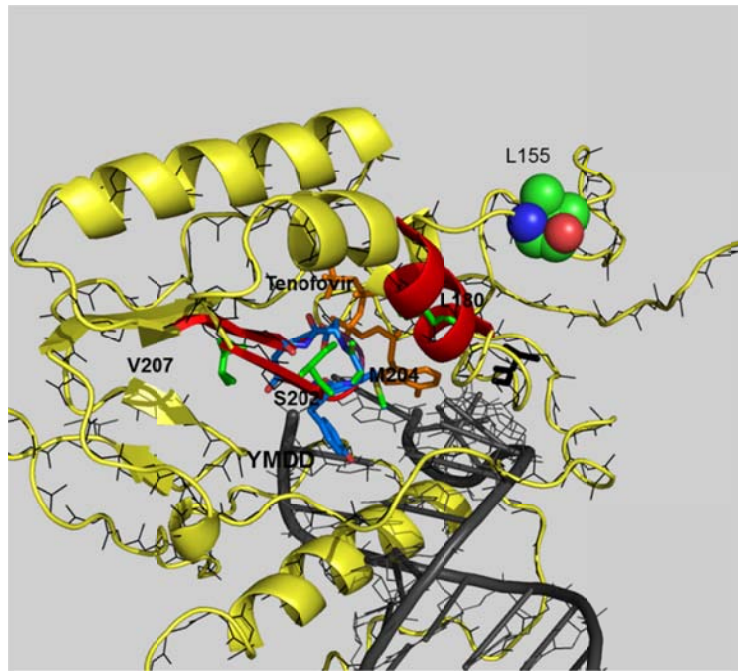


Figura 40: Model tridimensional del domini RT de la polimerasa del VHB. La representació del domini RT (en groc) està basada en l'estructura cristal·lina del centre catalític de la polimerasa del virus de la immunodeficiència humana (filament negre solapat a l'estructura del domini RT) (605). En aquest model hi ha una molècula de tenofovir (en taronja) bloquejant el centre actiu (YMDD, en blau). El dúplex DNA-RNA format durant la retrotranscripció de l'ARN pregenòmic del VHB està en gris fosc. També s'identifiquen algunes de les posicions més importants per la resistència a anàlegs de nucleòsids i nucleòtids, així com el residu rtL155, situat a la superfície de l'estructura. Imatge corresponent a la figura suplementària S1 de l'article. El doctorand no ha participat directament en l'elaboració d'aquest model ni en l'adaptació a aquest article.

Variabilitat i conservació a l'ORF S: Pel que fa a l'ORF S es van detectar 21 substitucions d'aa en proporcions >0,1% de la quasiespècies del VHB (taula 8), més que en l'ORF P. Aquestes substitucions es troben agrupades sobretot fora de la seqüència del determinant "a" (s124-s147) on només la substitució sG145R [principal mutació relacionada amb l'escapament a la vacunació antiviral (175)] es trobava per sobre del 0,1% (taula 8). És especialment rellevant que vuit d'aquestes 21 substitucions donessin lloc a codons stop (*) prematurs (taula 8) que en conjunt representaven entre un 0,98% i un 2,1% de les quasiespècies en pretractament. D'aquestes vuit substitucions quatre estaven solapades amb posicions del domini RT relacionades amb la resistència a NUCs [rtA181T/sW172*, rtV191I/sW182*, rtM204I/sW196* i rtV207I/sW199* (438,439,606)]. En quant a la conservació dels codons de l'ORF S, en general es va observar que era inferior a la dels codons de l'ORF P, amb només 10 codons amb dn≤0,1% (taula 9).

Codó	S Canvi aa	Pacient (Mostra)				Mitjana de freqüències
		1 N=32.737	2 N=13.670	3 N=62.450	4 (4A) N=32.724	
145	G145R	0,089	0,154	0,059	0,138	0,110
156	W156*	0,171	0,132	0,138	0,208	0,162
160	K160N	13,495	25,018	12,629	12,945	16,022
161	Y161F	0,058	1,375	0,000	0,031	0,366
163	W163*	0,131	0,146	0,135	0,165	0,144
164	E164G	0,141	0,161	0,085	0,101	0,122
165	W165*	0,128	0,124	0,143	0,104	0,125
168	V168A	0,159	0,176	0,120	0,076	0,133
172	W172*	0,134	0,285	0,155	0,217	0,198
174	S174N	0,082	0,073	0,077	0,186	0,105
177	V177A	0,144	0,139	0,109	0,092	0,121
180	V180A	0,116	0,183	0,094	0,040	0,108
181	Q181R	13,495	25,018	12,629	12,945	16,022
182	W182*	0,156	0,161	0,184	0,666	0,292
186	L186P	0,147	0,205	0,094	0,095	0,135
191	W191*	0,082	0,256	0,136	0,183	0,164
192	L192P	0,055	0,183	0,149	0,092	0,120
194	A194V	0,049	74,982	0,062	0,061	18,789
196	W196*	0,134	0,578	0,131	0,119	0,241
198	M198I	0,147	0,168	0,338	0,156	0,202
199	W199*	0,128	0,388	0,141	0,131	0,197

Taula 8: Canvis d'aminoàcid en l'ORF S amb una freqüència promig > 0,1% de cada una de les quatre mostres de pretractament (1, 2, 3 i 4A, pacients 1, 2, 3 i 4 respectivament). La freqüència del canvi d'aminoàcid en cada mostra s'ha marcat en negreta si és > 0,1% i en gris si és < 0,03%. Aquesta taula no s'ha inclòs l'article. (S=ORF S del VHB, aa=aminoàcid, N=nombre de lectures de seqüència o "reads" per mostra, *=codó stop).

Residu de l'ORF S	(%) Canvis nt totals	(%) dn	<i>dn/ds</i>
P142	0,13	0,10	<i>3,14</i>
N146	0,14	0,10	<i>2,35</i>
C147	0,14	0,09	<i>1,89</i>
P151	0,15	0,09	<i>1,60</i>
F158	0,15	0,09	<i>1,62</i>
K160	0,14	0,09	<i>1,81</i>
L162	0,12	0,06	<i>1,00</i>
L175	0,16	0,07	<i>0,75</i>
L176	0,17	0,06	<i>0,48</i>
P188	0,17	0,10	<i>1,43</i>

Taula 9: Conservació dels codons de l'ORF S. Es mostra per cada codó la freqüència de canvis de nucleòtid (nt) totals, la freqüència dels que impliquen un canvi d'aminoàcid (no sinònims, dn) i la relació entre els canvis no sinònims i sinònims (ds), els quals no impliquen un canvi d'aminoàcid, (dn/ds). La relació dn/ds indica quin tipus de canvis de nt sol afectar al codó, cosa que estima la pressió evolutiva sobre ell. Aquesta taula s'ha obtingut a partir de la taula suplementària S2 de l'article.

Variabilitat relativa entre els ORFs P i S: Finalment s'ha comparat la variabilitat dels ORFs P i S posició a posició, restant els percentatges de variabilitat de l'ORF S dels de l'ORF P. Cada codó d'un dels ORFs té solapades posicions de dos codons de l'altre. En aquest estudi s'han publicat els resultats de la resta entre els codons en que el primer nt en l'ORF P correspon al tercer en l'ORF S, que estan representats gràficament a la figura 3 de l'article (veure annex 1). També es va fer aquesta resta entre els codons que compartien el segon i tercer nt en l'ORF P amb el primer i segon en l'ORF S, amb resultats similars que no s'han inclòs a l'article. En general l'ORF S va mostrar més variabilitat que el P, tal com ja indicava el fet que tingués més posicions d'aa amb canvis per sobre del 0,1% de la quasiespècies del VHB i menys codons conservats (amb $dn \leq 0,1\%$). Tot i així, la variabilitat relativa d'aquests dos ORFs canvia al llarg de la seqüència analitzada: A la regió N-terminal, que correspon als aa rtY148-rtY158 en l'ORF P i sT140-sI150 en el S, l'ORF S va ser el més conservat a pesar de la tendència general. Aquesta regió correspon a l'extrem C-terminal del determinant "a", on es troben tres dels 10 codons de l'ORF S amb $dn \leq 0,1\%$, sP142, sN146 i sC147, amb funcions importants en la secreció i infectivitat de les partícules virals (146,147,262). En canvi la regió C-terminal, que correspon als aa rtR192-rtV208 en l'ORF P i sV184-sY200 en el S va ser el més conservat. En aquesta regió es troba el motiu essencial YMDD del centre catalític del domini RT, molt conservat en les ARN polimerases de diferents virus de plantes i animals (116). Així doncs, tot i solapar-se en la mateixa seqüència de nt, els dos ORFs evolucionen independentment per

conservar les posicions essencials que permeten realitzar les seves funcions als productes que codifiquen, com ja s’havia descrit anteriorment (138).

3.3.3. Anàlisi longitudinal de les mostres del tractament seqüencial amb NUCs:

S’han validat 136.708 “reads” corresponents a cinc mostres seqüencials del pacient 4 obtingudes en un període sense tractament (4A i 4B) i durant el tractament seqüencial (4C a 4E). L’evolució dels nivells d’ADN viral i de nivells d’alanina aminotransferasa (ALT) d’aquest pacient durant el període estudiat es representen a la figura 4 de l’article (veure annex 1). Com en les mostres de pretractament, cada un d’aquests “reads” s’ha alineat contra la seqüència màster de la mostra a la que corresponia per tal de calcular la freqüència de cada canvi d’aa en relació a aquesta seqüència (taula 10).

Mostra	Màster nucleòtids	Màster ORF P	Màster ORF S
4A	TACAAAACCTACGGACGGAAATTGCAC CTGTATTCCCATCCCATCGTCTTGGGC TTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTCCCCACTGTTTGGCTTTC AGCTATATGGATGATGTGGTA	YKTYGRKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL LAQFTSAICSVVRRAF PHCLAFSYMDDVV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAKYLWEWASVRFS WLSLLVPFVQWFVGLS PTVWLSAIWMMW
4B	TACAAAACCTACGGACGGAAATTGCAC CTGTATTCCCATCCCATCGTCTTGGGC TTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTCCCCACTGTTTGGCTTTC AGCTATATGGATGATGTGGTA	YKTYGRKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL LAQFTSAICSVVRRAF PHCLAFSYMDDVV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAKYLWEWASVRFS WLSLLVPFVQWFVGLS PTVWLSAIWMMW
4C	TACAAAACCTACGGACGGAAATTGCAC CTGTATTCCCATCCCATCGTCTTGGGC TTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCTTGACTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTCCCCACTGTTTGGCTTTC AGCTATATGGATGATGTGGTA	YKTYGRKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL LTQFTSAICSVVRRAF PHCLAFSYMDDVV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAKYLWEWASVRFS *
4D	TACAAAACCTACGGACGGAAATTGCAC CTGTATTCCCATCCCATCGTCTTGGGC TTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCTTGACTCAGTTT	YKTYGRKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL LTQFTSAICSVVRRAF PHCLAFSYMDDVV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAKYLWEWASVRFS *

	ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTC AGCTATATGGATGATGTGGTA		
4E	TACAAAACCTACGGACGGAAATTGCAC CTGTATTTCCCATCCCATCGTCTTGGGC TTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGC CTCAGTCCGTTTCTCATGGCTCAGTTT ACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGT AGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTC GGCTATGTGGATGATATCGTA	YKTYGRKLHLYSHPIV LGFRKIPMGVGLSPFL MAQFTSAICSVVRRAF PHCLAFGYVDDIV	TKPTDGNCTCIPIPSS WAFAKYLWEWASVRF5 WLSLLVPFVQWFVGLS PTVWLSAMWMMIS

Taula 10: Seqüències més representades (màster) obtingudes en cada una de les cinc mostres seqüencials del pacient 4 (4A i 4B en un període sense tractament i 4C després del tractament amb lamivudina, 4D després d'adefovir i 4E després d'entecavir). Es mostra la seqüència de nucleòtids i la seva traducció a aminoàcids en els ORFs P i S. Aquestes seqüències s'han inclòs a l'article com a material suplementari dins els "datasets" S1 (alineament de les seqüències de nucleòtids), S2 (alineament de les seqüències d'aminoàcids en l'ORF P) i S3 (alineament de les seqüències d'aminoàcids en l'ORF S). *=codó stop

Variabilitat de l'ORF P: La variabilitat longitudinal de la quasiespècies del VHB es va avaluar ordenant cada substitució d'aa d'acord amb la desviació estàndard (SD) de les seves freqüències en els "reads" validats de les cinc mostres seqüencials. Així el canvi d'aa que tingui freqüències més variables al llarg de l'anàlisi longitudinal seria el que tindria un SD més elevat. Aquest mètode de selecció "a cegues" dels canvis d'aa amb una freqüència més variable al llarg de l'anàlisi longitudinal ha ordenat com els set més variables canvis amb una associació ben caracteritzada a la residència al tractament amb NUCs: rtL180M, rtM204V, rtS202G, rtV207I, rtA181T, rtV173L i rtI169T (430,607), seguits d'altres canvis també associats a la resistència a NUCs però alguns d'ells menys comuns rtV191I, rtM204I, rtT184A, rtA181S i rtA200V (430,439,608) (taula 11). Donada la resistència a múltiples NUCs que va experimentar aquest pacient, aquests resultats són els que cabria esperar obtenir, la qual cosa confirma la utilitat de la metodologia establerta en aquest estudi com una eina per "escanejar" el genoma del VHB, o inclús altres genomes virals, a la recerca dels canvis rellevants per explicar situacions clíniques o fenòmens virològics com les resistències creuades o múltiples al tractament antiviral. A més, la capacitat d'aquesta metodologia per avaluar la variació de les freqüències dels diferents canvis d'aa, permet obtenir resultat comparables als d'assaigs fenotípics en els que es va caracteritzar la sensibilitat d'aquestes posicions al tractament antiviral (439,525) cosa que suggereix la seva utilitat per avaluar els efectes d'una determinada pressió selectiva sobre una quasiespècies viral.

Canvis d'aminoàcid	Mostra					SD
	4A N=32.724	4B N=35.662	4C N=25.289	4D N=19.740	4E N=23.249	
L180M	0	0,01 ⁿ	5,02	0,6	99,3	48,8
M204V	0,02 ⁿ	0	5,6	0,7	99,4	48,7
S202G	0	0,02 ⁿ	0,15	0,08	80,9	40,4
V207I	0,01 ⁿ	0,02 ⁿ	3,9	0,8	80,9	39,7
A181T	0,09	0,05	71,7	64	0,23	39,2
V173L	0,05	0,04	1,4	0,13	18,2	8,9
I169T	0	0	0,04	0	17,3	8,7
V191I	0,59	1,09	5,8	8,0	0,02 ⁿ	3,8
M204I	0,08	0,03	1	0,09	0	0,5
T184A	0,01 ⁿ	0	0,04	0,06	0,91	0,44
A181S	0,02 ⁿ	0,01 ⁿ	0,47	0,23	0	0,22
A200V	0,02 ⁿ	0,01 ⁿ	0,01 ⁿ	0,04	0,38	0,18
I162T	0,08	0,06	0,18	0,16	0	0,08
K149N	0,02 ⁿ	0	0,06	0,17	0	0,08
L157M	0,19	0,14	0,19	0,16	0,02 ⁿ	0,08
K154Q	0,05	0,01 ⁿ	0,05	0,18	0,06	0,08
R153W	0,06	0,01 ⁿ	0,05	0,18	0,03	0,07
V163I	0,10	0,04	0,17	0,14	0,03	0,07
V173M	0,07	0,04	0,15	0,10	0	0,06
K154T	0,01 ⁿ	0,03	0,10	0,13	0	0,06
I169L	0,03	0,03	0,15	0,12	0,08	0,06
R167H	0,06	0,03	0,02 ⁿ	0,04	0,12	0,05
V207M	0,13	0,05	0,04	0,07	0,12	0,04
G152R	0,08	0,04	0,04	0,03	0,11	0,03
R153Q	0,13	0,06	0,06	0,12	0,07	0,03
A194T	0,07	0,07	0,05	0,10	0,06	0,02

Taula 11: Freqüències dels 26 canvis d'aminoàcid de l'ORF P que van mostrar una variabilitat més gran de les seves freqüències entre les cinc mostres de tractament seqüencial (4A i 4B en un període sense tractament i 4C després del tractament amb lamivudina, 4D després d'adefovir i 4E després d'entecavir), ordenades segons la seva desviació estàndard (columna SD). Els 10 canvis d'aminoàcid marcats en negreta són els que es van incloure a l'anàlisi de lligament (veure apartat "Linkage Analysis" a l'ORF P). Les freqüències marcades en negreta són les >0,1%, i les marcades amb el símbol ⁿ estan per sota del límit de sensibilitat del sistema (0,03%). Aquesta taula correspon a la taula 3 de l'article (veure annex 1).

Variabilitat de l'ORF S: A l'ORF S es van detectar 51 canvis d'aa diferents en freqüències >0,1% en com a mínim una de les mostres seqüencials (taula 12). Les posicions més variables van ser les solapades amb residus de l'ORF P associats a la resistència a tractaments antivirals. En el seguiment longitudinal d'aquest pacient s'observa una elevada freqüència de codons stop (tal com passava en pretractament), de manera que sis dels 20 canvis d'aa amb una freqüència mitjana més alta a les cinc mostres longitudinals donaven lloc a codons stop prematurs (taula 12). La freqüència d'aquests codons és especialment elevada en les mostres obtingudes després del tractament amb LAM (4C) i després d'ADV (4D) a causa de la mutació sW172* (taula 12) que correspon a la lectura a la ORF S del canvi de nt TGG → TGA (nt 668 a 670 de la seqüència de referència AM282986) en l'ORF S i GCT → ACT (nt 670 a 672 de la

seqüència de referència AM282986) a l'ORF P que dona lloc a la substitució rtA181T en la ORF P relacionada amb la resistència a aquests dos tractaments (430). Aquesta mutació es troba inclús a la seqüència màster (taula 10) d'aquestes dues mostres, i s'ha descrit "in vitro" que les variants amb aquest canvi són defectives per la secreció de partícules virals (438). Tal com passava amb els genomes amb mutacions als àcids aspàrtics essencials (D) del motiu YMDD en les mostres de pretractament, aquest fenomen suggereix un mecanisme de trans-complementació que en aquest cas faria possible la secreció de genomes amb la mutació sW172* mitjançant proteïnes de superfície funcionals produïdes per altres genomes que es troben a la mateixa quasiespècies com a variants minoritàries. Aquest mecanisme de secreció per les variants amb el canvi sW172* ja havia estat suggerit prèviament (538). De fet el mateix mecanisme podria ser vàlid per explicar la secreció de la resta de variants amb codons stop prematurs a l'ORF S en percentatges relativament elevats. En relació a aquesta trobada hem de recordar que les proteïnes de superfície es produeixen en un gran excés respecte les partícules virals i formen partícules subvirals (SVP) (22) fet per el que s'ha suggerit una funció immunomoduladora. No obstant, una vegada observada la significativa i sistemàtica presència de genomes del VHB amb codons stop prematurs a la regió S i per tant potencialment defectius per embolcallar les partícules virals, es podria suggerir que aquest excés de producció de HBsAg podria tenir com una de les seves funcions compensar la falta de producció de proteïnes de superfície funcionals per part de les variants amb codons stop.

Per altra banda, també es va observar que el canvi sS167L, que es troba dins l'epítot de limfòcits T CD4⁺ sW156-sL175 (599) va anar augmentant de proporció al llarg de les mostres estudiades: 4A: 0.2%, 4B: 0.7%, 4C: 1.1%, 4D: 1.3%, 4E: 4%. Cal fer esment que aquest canvi prové d'un canvi silent a l'ORF P, cosa que indica que no està associat a la pressió dels tractaments antivirals i reforça la hipòtesi que la pressió immune sigui la responsable d'aquest increment progressiu de les seves freqüències.

Codó	S Canvi aa	Mostra					Mitjana de freqüències
		4A N=32.724	4B N=35.662	4C N=25.289	4D N=19.740	4E N=23.249	
140	T140I	0,043	0,028	0,051	0,1179	0,009	0,049
141	K141T	0,009	0,003	0,055	0,167	0,004	0,048
143	T143M	0,076	0,104	0,055	0,177	0,064	0,095
144	D144E	0,040	0,109	0,210	0,203	0	0,112
144	D144V	0,012	0,036	0,012	0,101	0	0,032
144	D144G	0,015	0,067	0,095	0,243	0,013	0,087
145	G145R	0,138	0,056	0,063	0,122	0,077	0,091
145	G145E	0,098	0,093	0,146	0,147	0,047	0,106
146	N146H	0,006	0,028	0,103	0,132	0	0,054
149	C149Y	0,073	0,076	0,095	0,106	0,026	0,075
154	S154L	0,110	0,129	0,063	0,147	0,009	0,092
154	S154P	0,079	0,059	0,178	0,162	0,009	0,097
154	S154*	0,077	0,093	0,059	0,132	0,009	0,074
155	S155F	0,092	0,022	0,051	0,106	0,039	0,062
156	W156*	0,208	0,121	0,273	0,380	0,060	0,208
157	A157V	0,092	0,050	0,083	0,122	0,004	0,070
159	A159V	0,131	0,064	0,107	0,096	0,030	0,086
159	A159T	0,064	0,034	0,016	0,041	0,120	0,055
160	K160N	12,945	0	0	0	0	2,589
161	Y161S	0,024	0,034	0,047	0,122	0,039	0,053
161	Y161H	0	0,003	0,043	0	17,327	3,475
163	W163*	0,165	0,028	0,055	0,086	0,043	0,075
164	E164G	0,101	0,070	0,043	0,132	0,009	0,071
164	E164D	0,052	0,036	1,435	0,132	18,216	3,974
165	W165*	0,104	0,022	0,047	0,111	0,043	0,066
167	S167L	0,196	0,662	1,076	1,332	3,988	1,451
169	R169P	0	0	0,103	0,096	0	0,040
172	W172*	0,217	0,107	71,790	63,977	0,240	27,266
172	W172C	0,021	0,014	0,451	0,223	0	0,142
173	L173P	0,025	0,119	0,031	0,071	0,004	0,050
174	S174N	0,186	0,149	0,174	0,187	0,013	0,142
181	Q181R	12,945	0	0	0	0	2,589

181	R181P	0,024	0,006	0,087	0,101	0	0,044
182	W182*	0,666	1,108	5,860	8,217	0,030	3,176
184	V184A	0,046	0,036	0,032	0,137	0,150	0,080
185	G185E	0,089	0,050	0,067	0,117	0,069	0,078
189	T189I	0,110	0,053	0,059	0,046	0,013	0,056
191	W191*	0,183	0,087	0,134	0,360	0,039	0,161
192	L192F	0,024	0,003	0,008	0,041	0,374	0,090
193	S193L	0,070	0,042	0,051	0,071	0,236	0,094
194	A194V	0,061	0,039	0,233	0,056	0,425	0,163
195	I195M	0,021	0,003	5,591	0,704	99,373	21,139
196	W196*	0,119	0,079	0,680	0,101	0,069	0,210
196	W196L	0,003	0,003	0,308	0,015	0,009	0,068
198	M198I	0,156	0,070	4,116	0,902	81,029	17,255
199	W199*	0,131	0,067	0,170	0,380	0,009	0,151
199	W199S	0,015	0,011	4,065	0,679	80,664	17,087
199	W199L	0,006	0,011	0,020	0,010	0,236	0,057
200	Y200F	0,009	0,017	0,206	0,076	0	0,062
200	Y200S	0,037	0,014	0,055	0,137	0	0,049
200	Y200C	0,040	0,039	0,100	0,127	0,004	0,062

Taula 12: Canvis d'aminoàcid en l'ORF S amb una freqüència >0,1% en cada una de les cinc mostres seqüencials del pacient 4 (4A i 4B en un període sense tractament i 4C després del tractament amb lamivudina, 4D després d'adefovir i 4E després d'entecavir). La freqüència del canvi d'aminoàcid en cada mostra s'ha marcat en negreta si és >0,1% i en gris si és <0,03%. També s'ha marcat en negreta les 20 mitjanes de les freqüències dels canvis d'aa més altes. Aquesta taula no s'ha inclòs l'article. (S=ORF S del VHB, aa=aminoàcid, N=nombre de lectures de seqüència o "reads" per mostra, *=codó stop).

Divergències nucleotídiques i aminoacídiques al llarg de l'anàlisi longitudinal: Per cada mostra de l'estudi longitudinal del pacient també es van analitzar les divergències a nivell de nt i d'aa de dues maneres diferents: en primer lloc, calculant el percentatge de seqüències diferents de la màster en la mostra basal del primer tractament (mostra 4A, taula 10) i com el percentatge de mostres diferents de la seqüència màster de la mateixa mostra. Els resultats d'aquest anàlisi es resumeixen a la taula 4 de l'article (veure annex 1). La divergència a nivell de la seqüència de nt respecte a la màster de la mostra basal experimenta un gran augment després del tractament amb NUCs respecte als valors del pretractament. A més també s'observa aquesta diferència quan comparem la divergència de les seqüències de cada mostra respecte la màster de la mateixa mostra, tot i que en la mostra 4E s'observa una lleugera disminució respecte les mostres anteriors (4C i D), probablement per la intensa selecció de la variant associada a la resistència a ETV, com es veurà en els següent apartat (taula 13). Tot plegat reflecteix la diversificació de la quasiespècies del VHB per adaptar-se a la pressió exercida pel tractament amb NUCs. A més, el

tractament amb NUCs no és la única pressió que modula la divergència respecte les seqüències màster de la mostra basal i de cada mostra, l'acció del sistema immunitari sobre la quasiespècies viral es pot observar a nivell d'aa, en el que l'ORF S sempre presentava una divergència lleugerament més elevada que el P quan es comparava cada seqüència amb la màster de la mateixa mostra. Així doncs l'ORF S sempre sol ser més variable que el P, tal com s'observava en les mostres de pretractament, cosa que podria evidenciar la pressió continua del sistema immunitari sobre les proteïnes de superfície, juntament amb els canvis co-seleccionats amb les mutacions de l'ORF P que afecten a la sensibilitat al tractament amb NUCs. Quan es comparen les divergències dels ORF P i S respecte la seqüència màster de la mostra basal del tractament amb NUCs s'evidencia la pressió exercida pel tractament antiviral sobre la quasiespècies: en pretractament la divergència de S és més elevada que la de P però en introduir els tractaments antivirals amb NUCs les divergències tendeixen a igualar-se. Això reflecteix per una banda la diversificació de la quasiespècies del VHB per adaptar-se a la pressió exercida pel tractament amb NUCs, tal com ja es veia a nivell de nt, i per altra banda la influència dels canvis a l'ORF P sobre l'ORF S.

“Linkage Analysis” a l'ORF P: Finalment, els 10 canvis d'aa seleccionats d'acord amb la SD de les seves freqüències en els “reads” validats de les cinc mostres seqüencials (taula 11) s'han inclòs en un anàlisi de lligament o “linkage analysis”, per tal d'estudiar les seves combinacions dins una mateixa variant. S'han seleccionat aquests 10 canvis, per una banda perquè s'ha assumit que aquests són els més rellevants per estudiar l'adaptació de la quasiespècies del VHB al tractament antiviral amb NUCs, de fet els 10 canvis seleccionats havien estat relacionats prèviament amb la resistència a NUCs. Per altra banda, s'ha limitat a 10 els canvis d'aa estudiats per facilitar l'anàlisi bioinformàtic de les seves combinacions. En la figura 5 de l'article (veure annex 1) es pot veure que les mutacions resistents a NUCs estaven presents majoritàriament com a combinacions dins el mateix genoma, excepte el cas de les variants amb la mutació rtA181T, que únicament es combinava amb rtV191I en variants en proporcions relativament baixes respecte les proporcions de les variants on era la única mutació present de les 10 estudiades. Aquestes variants van ser les dominants a la quasiespècies del VHB després dels tractaments amb LAM i ADV tot i causar el canvi sW172*, com ja s'ha comentat anteriorment. Per altra banda després del rebot virològic o “viral breakthrough” (VBK) amb ETV (mostra 4E) es van seleccionar variants amb combinacions força complexes de múltiples canvis d'aa en proporcions elevades, com la variant combinada rtL180M-rtS202G-rtM204V-rtV207I dominant la quasiespècies (72,4%), aquesta variant ja es detectava durant el tractament amb LAM com a variant minoritària amb una proporció del 0,1% de la quasiespècies (taula 13). La presència del canvi rtV207I en aquesta variant va ser inesperada, ja que en un estudi fenotípic previ es va demostrar la sensibilitat de la variant rtL180M-rtM204V-rtV207I a ETV

(609). A la taula 13 es pot veure com aquest canvi sol ser seleccionat en combinació amb rtM204V, la qual cosa suggereix que més que una resistència primària, rtV207I podria tenir un paper compensatori per restaurar l'eficiència replicativa de les variants amb el canvi rtM204V, que altera el motiu YMDD del centre actiu del domini RT. Per tal d'aportar més dades sobre l'associació entre rtM204V i rtV207I es van analitzar els resultats de tires de LiPA de primera generació, que incloïen sondes per detectar les dues mutacions (446) corresponents a 50 casos amb fallada al tractament amb LAM i es va veure que 20 (39%) dels 50 pacients tenien les dues mutacions (tot i que en aquest cas no es podia demostrar que coincidissin al mateix genoma). A més, tres d'aquests pacients van rebre posteriorment ETV i dos d'ells van experimentar un ràpid VBK. Així doncs aquest anàlisi retrospectiu indica que la compensació del canvi rtM204V per rtV207I és possible, tot i que hauria de ser demostrada mitjançant assaigs fenotípics. Aquesta troballa demostra la utilitat de la metodologia desenvolupada en aquest estudi com a eina d'“escàner” dels genomes virals per detectar canvis rellevants, amb un possible valor d'assaig fenotípic.

Variants combinades	Mostra					SD
	4A N=32.724	4B N=35.662	4C N=25.289	4D N=19.740	4E N=23.249	
169I-173V-180L-181A-184T-191V-202S-204M-207V (BC)	98,54	98,51	19,60	33,80	0,30	43,5
180M-202G-204V-207I	0,00	0,00	0,10	0,01 ⁿ	72,36	36,2
181T	0,09	0,05	64,08	56,45	0,10	34,9
169T-173L-180M-204V	0,00	0,00	0,00	0,00	10,00	5,0
181T-191I	0,00	0,00	4,39	6,57	0,01 ⁿ	3,3
169T-173L-180M-202G-204V-207I	0,00	0,00	0,01 ⁿ	0,00	4,59	2,3
180M-204V	0,00	0,00	0,28	0,01 ⁿ	3,20	1,6
180M	0,00	0,00	1,94	0,27	0,11	0,9
180M-202G-204V	0,00	0,00	0,00	0,00	1,82	0,9
180M-204V-207I	0,00	0,00	1,38	0,22	1,19	0,7
181T-204V-207I	0,00	0,00	1,24	0,18	0,00	0,6
173L-180M-204V	0,00	0,00	0,59	0,05	1,26	0,6
191I	0,59	1,08	0,78	1,32	0,00	0,6
173L-180M-184A-204V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,89	0,4
169T-180M-202G-204V-207I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,76	0,4
169T-173L-180M-204V-207I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,74	0,4
181T-204V	0,00	0,00	0,75	0,07	0,00	0,4
173L-180M-202G-204V-207I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,3
204V-207I	0,00	0,00	0,57	0,11	0,00	0,3
173L-180M	0,00	0,00	0,55	0,06	0,00	0,3
169T-180M-184A-202G-204V-207I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,3

204V	0,02 ⁿ	0,00	0,47	0,06	0,00	0,2
204I	0,08	0,03	0,43	0,02 ⁿ	0,00	0,2
169T-173L-180M-184A-204V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,2
173L-180M-184A-202G-204V-207I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,2
181T-207I	0,00	0,00	0,26	0,21	0,00	0,1
169T-180M-204V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,1
181T-204I	0,00	0,00	0,26	0,07	0,00	0,1
169T-173L-180M-202G-204V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,1
180M-184A-204V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,1
169T-173L-180M-184A-202G-204V-207I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,1
204I-207I	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,1
207I	0,01 ⁿ	0,02 ⁿ	0,13	0,08	0,00	0,1
173L-181T	0,00	0,00	0,12	0,02 ⁿ	0,00	0,1
173L	0,05	0,03	0,06	0,01 ⁿ	0,00	0,0
184A	0,05	0,01 ⁿ	0,05	0,02 ⁿ	0,00	0,0
202G	0,00	0,02 ⁿ	0,01 ⁿ	0,04	0,00	0,0

Taula 13: Anàlisi de lligament (“linkage”) dels 10 canvis d’aminoàcid de l’ORF P que van mostrar una variabilitat més gran de les seves freqüències entre les cinc mostres de tractament seqüencial (4A i 4B en un període sense tractament i 4C després del tractament amb lamivudina, 4D després d’adefovir i 4E després d’entecavir), ordenades segons la seva desviació estàndard (columna SD). Les freqüències $\geq 1\%$ d’aquestes combinacions es mostren en negreta, i les marcades amb el símbol ⁿ estan per sota del límit de sensibilitat del sistema (0,03%). BC=Combinació basal. La combinació dels aa “wild-type” de les posicions corresponents als 10 canvis d’aminoàcid analitzats. Aquesta taula correspon a la taula 5 de l’article (veure annex 1).

3.3.4. Conclusions:

1. La UDPS permet l’anàlisi quantitatiu de la composició de variants de la quasiespècies del VHB, inclús les que contenen combinacions complexes de canvis d’aa. Tot i això cal tenir en compte els errors inherents a l’amplificació per PCR o del propi sistema, que poden esbiaixar els resultats. Per tal de minimitzar aquest biaix cal aplicar algoritmes molt astringents sobre els resultats obtinguts i interpretar-los amb cura, tenint en compte els resultats previs amb tècniques fenotípiques.
2. Les freqüències de les variants amb canvis d’aa relacionats amb la resistència a NUCs que es troben per sobre del 0,1% del total de la quasiespècies del VHB en pretractament, no van preveure les freqüències d’aquests canvis observades durant el tractament amb LAM en el pacient tractat seqüencialment.
3. En general l’ORF S presenta una variabilitat més gran que l’ORF P. Aquesta variabilitat és independent entre els dos ORFs i no és homogènia al llarg de tota la seqüència analitzada, sol estar restringida en regions on hi ha motius importants per la funcionalitat dels productes codificats per cada ORF. Tot i així, en la regió on l’ORF S presenta un grau de conservació

més elevat (el determinant “a”) es troba solapat el residu rtL155 de l’ORF P, que ha estat amb diferència la posició més conservada de les dels dos ORFs. Aquest alt grau de conservació pot tenir implicacions funcionals i/o estructurals per la polimerasa del VHB.

4. L’anàlisi profund de la quasiespècies del VHB ha mostrat un elevat percentatge de genomes defectius en pretractament i durant l’anàlisi longitudinal, per canvis en residus essencials del centre actiu del domini RT i especialment per selecció de codons Stop a l’ORF S. Aquests codons stop es seleccionen en elevats percentatges de variants durant el tractament antiviral seqüencial i fins i tot arriben a dominar la quasiespècies del VHB. Tot això suggereix un elevat grau de trans-complementació entre les múltiples variants del VHB que infecten una mateixa cèl·lula.
5. L’anàlisi de la SD de les freqüències de les variants durant l’anàlisi longitudinal de les quasiespècies virals és un eina d’“escàner”, que permet ressaltar els canvis d’aa relacionats o responsables dels esdeveniments clínics o virològics més importants que tenen lloc durant el període analitzat. A més l’anàlisi quantitatiu realitzat per aquest mètode pot donar-li utilitat addicional com a assaig fenotípic.
6. A més de l’anàlisi de variants i canvis concrets a les quasiespècies virals, la UDPS també permet fer un anàlisi global de la seva evolució a través d’un determinat període de temps, mitjançant la quantificació de la divergència a nivell de nt i aa en un anàlisi longitudinal al llarg d’aquest període.
7. L’anàlisi del lligament de canvis d’aa en una mateixa variant completa la visió parcial de la quasiespècies que mostra l’anàlisi de les freqüències dels canvis individuals. Així, aquest anàlisi ha demostrat que els canvis relacionats amb la resistència a NUCs agrupats en variants combinades (a excepció de rtA181T/sW172*) van ser la principal causa de la resistència al tractament amb NUCs del pacient tractat seqüencialment.

3.4. ARTICLE ORIGINAL:

Rodríguez-Frías F, Tabernero D, Quer J, Esteban JI, Ortega I, Domingo E, et al. Ultra-deep pyrosequencing detects conserved genomic sites and quantifies linkage of drug-resistant amino acid changes in the hepatitis B virus genome. PLoS One. 2012;7(5):e37874.

DOI: 10.1371/journal.pone.0037874

S’inclou l’article original a l’annex 1.

4. SEGON ESTUDI: HEPATITIS B VIRUS QUASISPECIES EVOLUTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN PATIENTS UNDER LONG-TERM LAMIVUDINE PROPHYLAXIS WITH OR WITHOUT HEPATITIS B IMMUNE GLOBULIN

4.1. INTRODUCCIÓ:

La malaltia hepàtica en etapa terminal (ESLD) constitueix la fase final de descompensació hepàtica, que es caracteritza per complicacions que posen en risc la vida del pacient, com hemorràgia per varius esofàgiques o hepatocarcinoma (HCC), combinades amb múltiples símptomes debilitants, com ascites, fatiga extrema, pruija, i caquèxia (610). A més, molts pacients pateixen deteriorament cognitiu que pot ser des d'un moderat deteriorament crònic a una encefalopatia hepàtica severa o fins i tot coma (610). En pacients amb hepatitis B crònica (HBC) i ESLD la millor opció de tractament és el transplantament hepàtic ortotòpic (OLT), però la infecció per virus de l'hepatitis B (VHB) pot presentar recurrència post-transplantament. La recurrència del VHB post-transplantament és alta sense profilaxi antiviral (80% o superior) amb el conseqüent augment de la mortalitat i la pèrdua de l'òrgan trasplantat per part dels pacients (556–558) (veure 2.5.2. Trasplantament hepàtic).

La introducció a principis de la dècada de 1990 de la immunoprofilaxi passiva amb les immunoglobulines contra el VHB (HBIg), preparades a partir d'un pool del plasma de donants que tenen nivells elevats d'anticossos policlonals contra el l'antigen de superfície del VHB (anti-HBs) (559), i sobretot amb la combinació d'aquestes amb anàlegs de nucleòtids o nucleòsids (NUCs) ha millorat molt el pronòstic d'aquests pacients (433,434). La combinació de lamivudina (LAM) i/o adefovir (ADV)+HBIg ha reduït el risc de re-infecció del fetge trasplantat a menys del 10% dels casos (611,612), tot i que la utilització a llarg termini d'aquests NUCs (la durada del tractament profilàctic és indefinida) està associada al desenvolupament de resistències, igual que en la resta de pacients amb HBC (523–527). La utilització de HBIg també té desavantatges associats, com la necessitat regular d'injeccions parenterals i monitorització de nivells d'anticossos, l'elevat cost, disponibilitat limitada, efectes secundaris i la potencial selecció de mutants d'escapament immunitari [sobretot al determinant “a” de l'antigen de superfície del VHB (HBsAg) (143)] que poden limitar la seva efectivitat. A més, algunes de les variants seleccionades pels NUCs també donen lloc a la selecció de variants amb afinitat reduïda per la unió a anti-HBs com per exemple rtWR153Q/sG145R, rtV173L/sE164D, rtM204I/sW196S, rtM204V/sI195M (437). Actualment s'estan estudiant règims més curts i dosis més baixes de HBIg i altres formes de profilaxi. En aquest sentit entecavir (ETV)+HBIg o inclús ETV sol han donat bons resultats com a tractaments profilàctics

(613,614). Tot i això avui en dia LAM+HBIG encara és el tractament profilàctic estàndard contra la recurrència post-transplantament del VHB, però hi ha poques dades que comparin l'efectivitat a llarg termini de la monopofilaxi amb LAM i la profilaxi amb combinació de LAM+HBIG.

4.2. HIPÒTESI I OBJECTIUS:

4.2.1. Hipòtesis:

1. El tractament a llarg termini amb LAM o LAM+HBIG és efectiu per evitar la recurrència del VHB després del transplantament hepàtic ortotòpic.
2. La replicació del VHB a pesar del tractament profilàctic amb LAM o LAM+HBIG està associada a alteracions en les regions de les proteïnes virals on actuen directament, el bucle antigènic de les proteïnes de superfície, especialment el determinant "a", i els dominis funcionals B i C del domini transcriptasa reversa (RT) de la polimerasa viral.

4.2.2. Objectius:

1. Estudiar l'eficàcia del tractament profilàctic a llarg termini amb LAM o LAM+HBIG, en pacients que han rebut OLT per complicacions relacionades amb la infecció per VHB.
2. En pacients amb recurrència post-trasplantament del VHB, estudiar abans i després del trasplantament la quasiespècies del VHB en la regió solapada dels ORFs P i S que codifica el bucle antigènic de les proteïnes de superfície i els dominis funcionals B i C del domini RT de la polimerasa viral. D'aquesta manera es pretén caracteritzar els canvis que experimenta la quasiespècies viral durant la recurrència del VHB.

4.3. RESUM DE L'ESTUDI:

Aquest estudi és la continuació d'un que va començar a principis de la dècada de 2000, per tant el doctorand no ha participat en les seves fases inicials, els resultats de les quals ja van ser publicats abans de començar aquest projecte de tesi doctoral (615,616). El doctorand ha coordinat l'estudi de les quasiespècies del VHB en alguns dels pacients que van experimentar recurrència del VHB post-trasplantament i ha analitzat les dades obtingudes. Tot i així, les mostres analitzades pertanyen als períodes inicials d'aquest estudi, per tant les dades obtingudes llavors són rellevants per la seva relació amb els resultats obtinguts de l'anàlisi de les

quasiespècies virals i també seran comentades a continuació, així com també l'actualització del seguiment dels pacients fins el moment d'aquest estudi.

En aquest estudi s'han inclòs inicialment 29 pacients que van rebre OLT per patologies hepàtiques associades al VHB entre el març de 1998 i l'abril de 2000 i van entrar en un estudi multicèntric aleatoritzat que comparava l'efectivitat per evitar la recurrència posttransplantament del VHB de la monoteràpia amb LAM i la combinació LAM+HBIg (615). Els criteris amb els que es va reclutar aquests pacients són:

- Home o dona d'edat ≥ 16 anys.
- Elegibles per a OLT a causa d'ESLD associada a HBC.
- HBsAg detectable durant ≥ 24 setmanes abans del cribratge (és a dir, amb HBC).
- ADN-VHB $< 2,5$ pg/mL² en el moment de l'OLT, amb o sense tractament amb LAM.
- Els pacients diagnosticats de HCC abans del transplantament només van ser inclosos si tenien un sol tumor ≤ 3 cm de diàmetre i sense evidència de malaltia extrahepàtica.
- No es van tenir en compte les co-infeccions amb virus de l'hepatitis C o D (VHC o VHD).

El disseny d'aquest estudi es resumeix en la figura 41:

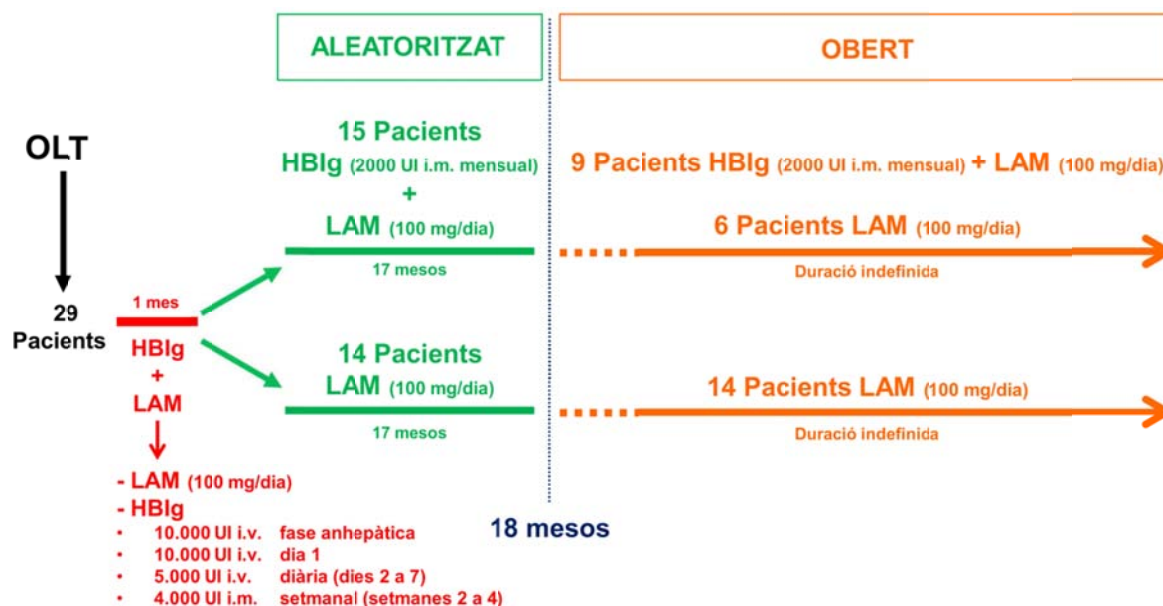


Figura 41: Disseny de l'assaig multicèntric aleatoritzat on es van incloure els pacients d'aquest estudi. Durant el primer mes post-transplantament tots els pacients van rebre lamivudina (LAM) a una dosi de 100 mg/dia combinat amb dosis decreixents d'immunoglobulines contra el VHB (HBIg) primer per via intravenosa (i.v.) i al final per via intramuscular (i.m.). A partir del primer mes i fins el 18 post-transplantament es va assignar aleatòriament els pacients a dos grups diferents: a 15 d'ells se'ls va administrar HBIg+LAM i a 14 LAM en monoteràpia. Després d'aquests 18 mesos el tractament profilàctic amb HBIg+LAM o LAM en monoteràpia es va deixar a la decisió dels investigadors, de

² La tècnica de referència en per la mesura de l'ADN-VHB a l'inici de l'estudi consistia en la hibridació per "branched DNA" i el seu nivell de sensibilitat era $2,5$ pg/mL $\approx 7.5 \times 10^5$ còpies/mL $\approx 1.5 \times 10^5$ unitats internacionals (UI)/mL.

manera que 20 pacients van continuar el tractament profilàctic amb LAM en monoteràpia (els 14 que van ser tractats inicialment amb LAM i sis del grup de HBIg+LAM) i nou van continuar amb HBIg+LAM. Les dosis de cada pauta de tractament s'indiquen a l'esquema. OLT=transplantament hepàtic ortotòpic

Durant el seguiment a llarg termini dels pacients s'han monitoritzat el HBsAg, antigen e del VHB (HBeAg) i els nivells d'alanina aminotransferasa (ALT) i ADN-VHB cada tres mesos fins al mes 18 post-transplantament, i cada sis mesos a partir de llavors. Al llarg del seguiment d'aquests pacients durant més de 10 anys s'han utilitzat diferents tècniques per monitoritzar els paràmetres serològics i virològics rellevants per determinar la recurrència post-OLT (el HBsAg i els nivells d'ADN-VHB, taula 14)

Nom de la tècnica	Paràmetre monitoritzat	Principi de mesura	Sensibilitat
Abbott-Auszyme Mc assay (Abbott Laboratories, USA)	HBsAg	Radioimmunoassaig	0,7 ng/mL (Abbott)
VITROS HBsAg assay (Ortho Clinical Diagnostics, UK)	HBsAg	Enzimoimmunoassaig i quimiluminiscència	0,09 UI/mL del 1r. estàndard internacional de la Organització mundial de la salut (OMS)
Elecsys HBsAg II assay (Roche Diagnostics, Alemanya)	HBsAg	Enzimoimmunoassaig i quimiluminiscència	0,1 UI/mL del segon estàndard internacional de la OMS
Quantiplex HBV DNA (Chiron Corp., USA)	ADN-VHB	Hibridació ("branched DNA")	2.5 pg/mL
Sistema LightCycler (Roche Diagnostics, Alemanya)	ADN-VHB	PCR a temps real "in house"	10 ³ còpies/mL
COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, v2.0 (Roche Molecular Systems, USA)	ADN-VHB	PCR a temps real automatitzada	20 UI/mL

Taula 14: Diferents sistemes per detectar l'antigen de superfície del VHB (HBsAg) i els nivells d'ADN del VHB (ADN-VHB) utilitzats al llarg del seguiment dels pacients, ordenats en ordre cronològic en que s'han utilitzat per la detecció o mesura de cada paràmetre. Les equivalències entre les diferents unitats en que es mesuren els nivells de sensibilitat de les tècniques de detecció del HBsAg són 5,587 ng (Abbott)≈1 unitat internacional (UI) del 1r estàndard internacional de l' Organització mundial de la salut (OMS)≈33 UI del 2n estàndard internacional de la OMS (617).

Les equivalències entre les diferents unitats en que es mesuren els nivells de sensibilitat de les tècniques de quantificació de l'ADN-VHB són aproximadament 2⁵ pg/mL≈7.5x10⁵ còpies/mL≈1.5x10⁵ UI/mL).

L'eficàcia de les dues estratègies de tractament profilàctic s'ha valorat pel percentatge de pacients que van perdre el HBsAg i/o van aconseguir nivells indetectables d'ADN-VHB, utilitzant aquestes diferents tècniques amb diferents nivells de sensibilitat al llarg del seguiment dels pacients.

4.3.1. Anàlisi de l'eficàcia dels tractaments profilàctics:

La recurrència del VHB després de l'OLT es pot establir per la re-detecció del HBsAg, normalment acompanyada de nivells detectables d'ADN-VHB, o per la presència de nivells detectables d'ADN-VHB sense HBsAg. Tant per un criteri com per l'altre, el seguiment a llarg termini d'aquests pacients ha demostrat que tant LAM en monoteràpia com LAM+HBIG tenen una efectivitat similar per prevenir la recurrència del VHB després de l'OLT i un impacte similar en la supervivència dels pacients:

Durant els primers 18 mesos després del trasplantament (fase d'aleatorització, figura 41), la supervivència dels pacients i els fetges trasplantats va ser del 100%, sense cap cas de recurrència per HBsAg positiu. Inicialment tampoc es va detectar cap cas de recurrència per ADN-VHB, mitjançant la hibridació per "branched DNA". Tanmateix aquesta tècnica té una sensibilitat molt baixa, i el re-anàlisi posterior de les mostres mitjançant PCR a temps real "in house" amb el sistema LightCycler va permetre detectar nivells d'ADN-VHB entre 1.200 i 30.000 còpies/mL en quatre pacients (tres tractats amb LAM+HBIG i un amb LAM). A pesar d'això cap d'aquests pacients va experimentar augments dels nivells d'ALT durant aquest període, però la detecció de nivells d'ADN-VHB en aquests quatre pacients demostra la importància de monitoritzar els pacients amb les tècniques més sensibles disponibles.

La supervivència dels dos grups durant una mitjana de 154,2 mesos (12,85 anys) va ser del 70% LAM+HBIG i del 79% LAM (log-rank 0,125; P=0,723; figura 42). Durant el període d'estudi en obert (figura 41) quatre pacients van experimentar recurrència del VHB establerta per la re-detecció del HBsAg, entre 23 i 48 mesos post-OLT (els quatre primers anys). L'anàlisi de la supervivència dels dos grups per corbes de Kaplan-Meier no va mostrar diferències significatives entre la supervivència dels pacients amb recurrència HBsAg positiva i la resta (log-rank 0,073, P=0,787; figura 43 A). Per altra banda, tampoc es van observar diferències entre les dues estratègies profilàctiques en quant al percentatge acumulat de pacients amb recurrència del VHB amb HBsAg positiu (log-rank 0,27; P=0,603; figura 43 B). Cal tenir en compte també que la manca de diferències entre els dos grups podria ser a causa del nombre

relativament baix de pacients en cada un d'ells i per tant aquests resultats haurien de ser validats en un grup de pacients més gran. Dels 25 pacients restants vuit (quatre LAM+HBIG i quatre LAM, 32%) van registrar transitòriament nivells d'ADN-VHB de l'ordre de les 10^3 UI/mL en una mitjana de 2-3 determinacions, que no estaven relacionats amb canvis en el tractament immunosupressor ni amb pujades d'ALT.

Tot i els bons resultats a llarg termini de la profilaxi amb LAM o LAM+HBIG, aquests podrien millorar amb la utilització d'antivirals orals més potents, que actualment estan començant a ser provats per la profilaxi contra el VHB (613,614).

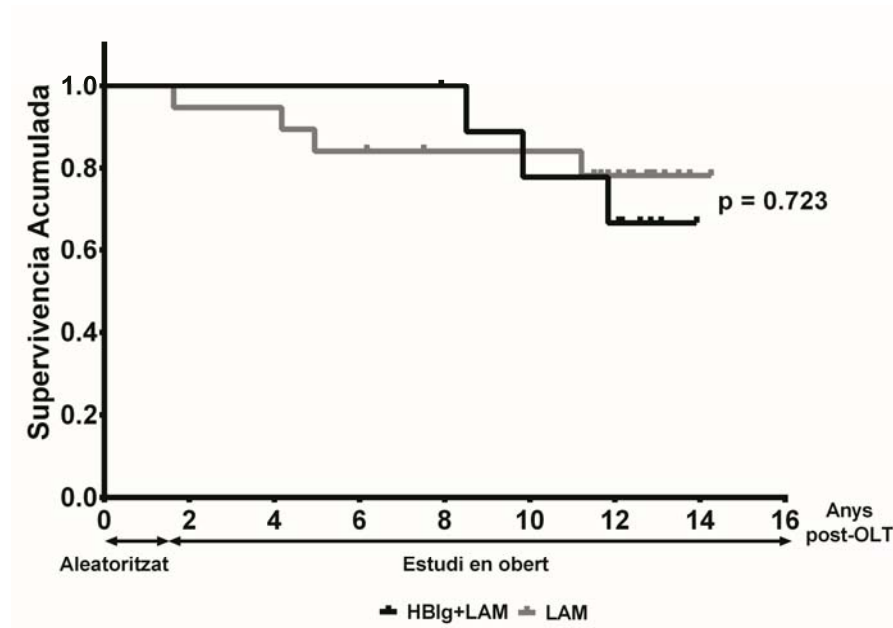


Figura 42: Supervivència acumulada al llarg dels 154,2 mesos (12,85 anys) de seguiment dels pacients després del trasplantament hepàtic ortotòpic (OLT) segons el tractament profilàctic rebut [lamivudina (LAM) en combinació amb immunoglobulina contra el virus de la hepatitis B (HBIG) o LAM en monoteràpia] (log-rank 0,125). L'estudi es divideix en una fase aleatoritzada i una en obert tal com s'explica a la figura 41. Aquesta figura correspon a la figura 2 de l'article.

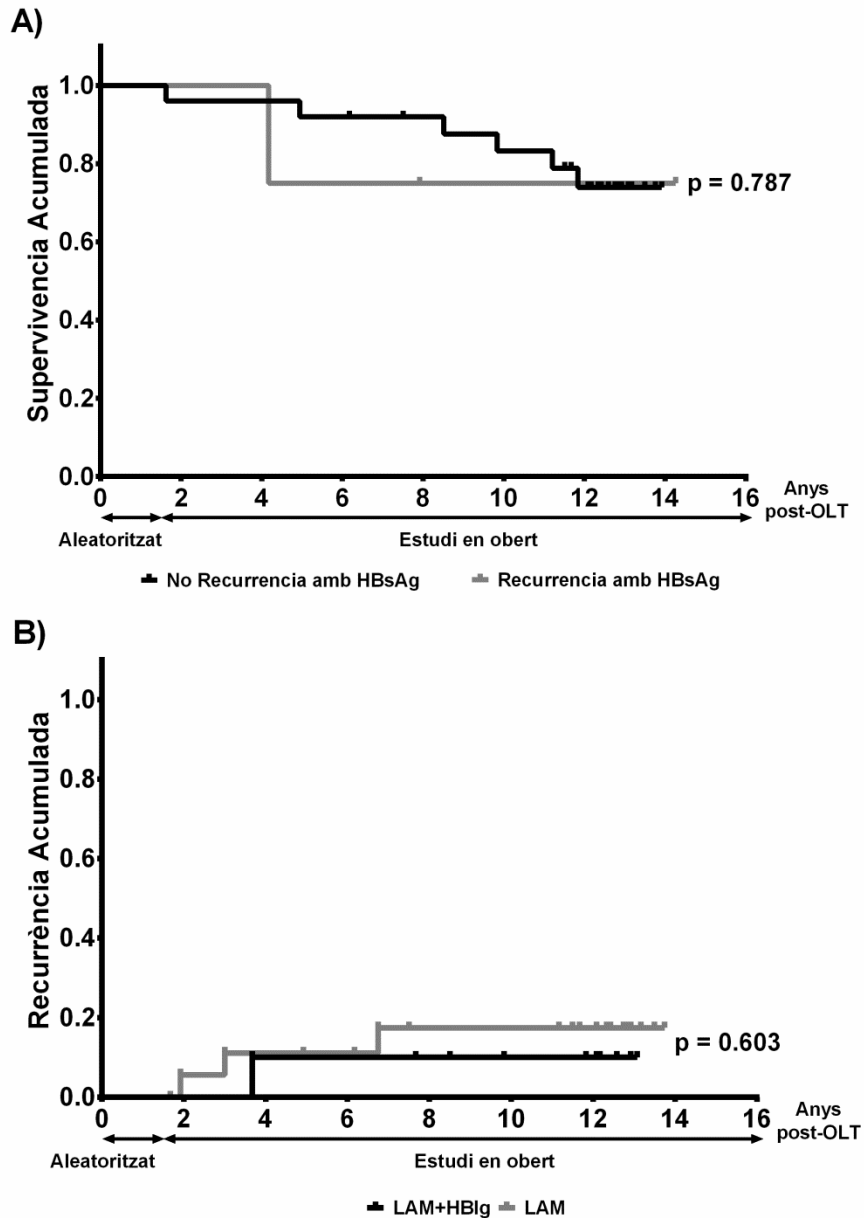


Figura 43: (A) Supervivència acumulada al llarg dels 154,2 mesos (12,85 anys) de seguiment dels pacients després del trasplantament hepàtic ortotòpic (OLT) segons si han experimentat recurrència del VHB amb HBsAg detectable o no (log-rank 0,073). (B) Percentatge acumulatiu de recurrència segons el tractament profilàctic rebut [lamivudina (LAM) en combinació amb immunoglobulina contra el virus de la hepatitis B (HBIg) o LAM en monoteràpia] (log-rank 0,27). L'estudi es divideix en una fase aleatoritzada i una en obert tal com s'explica a la figura 41. Aquesta figura correspon a la figura 3 de l'article.

4.3.2. Anàlisi de la quasiespècies del VHB en pacients amb recurrència post-trasplantament:

En aquest estudi s'ha analitzat per UDPS la regió del genoma del VHB que codifica les principals dianes sobre les que actua tant LAM com HBIg, que per tant s'ha considerat més rellevant per explicar la seva recurrència post-trasplantament. Aquesta regió inclou el centre

filtratge dels “reads” obtinguts, en un estudi diferent al que s’està comentant (386), que no ha estat realitzat pel doctorand tot i que hi ha col·laborat. En adaptar el sistema de filtratge a la nova tecnologia d’UDPS, també s’ha tingut en compte la simplificació i optimització de tot sistema d’anàlisi, des de l’amplificació de les biblioteques d’amplicons fins a l’algorisme d’anàlisi bioinformàtic, de manera que es pugui aplicar de manera més automatitzada que en l’estudi anterior. Gràcies a aquesta simplificació, recentment s’ha pogut adaptar al genotipat assistencial d’alta resolució del VHC (618) (figura 45):

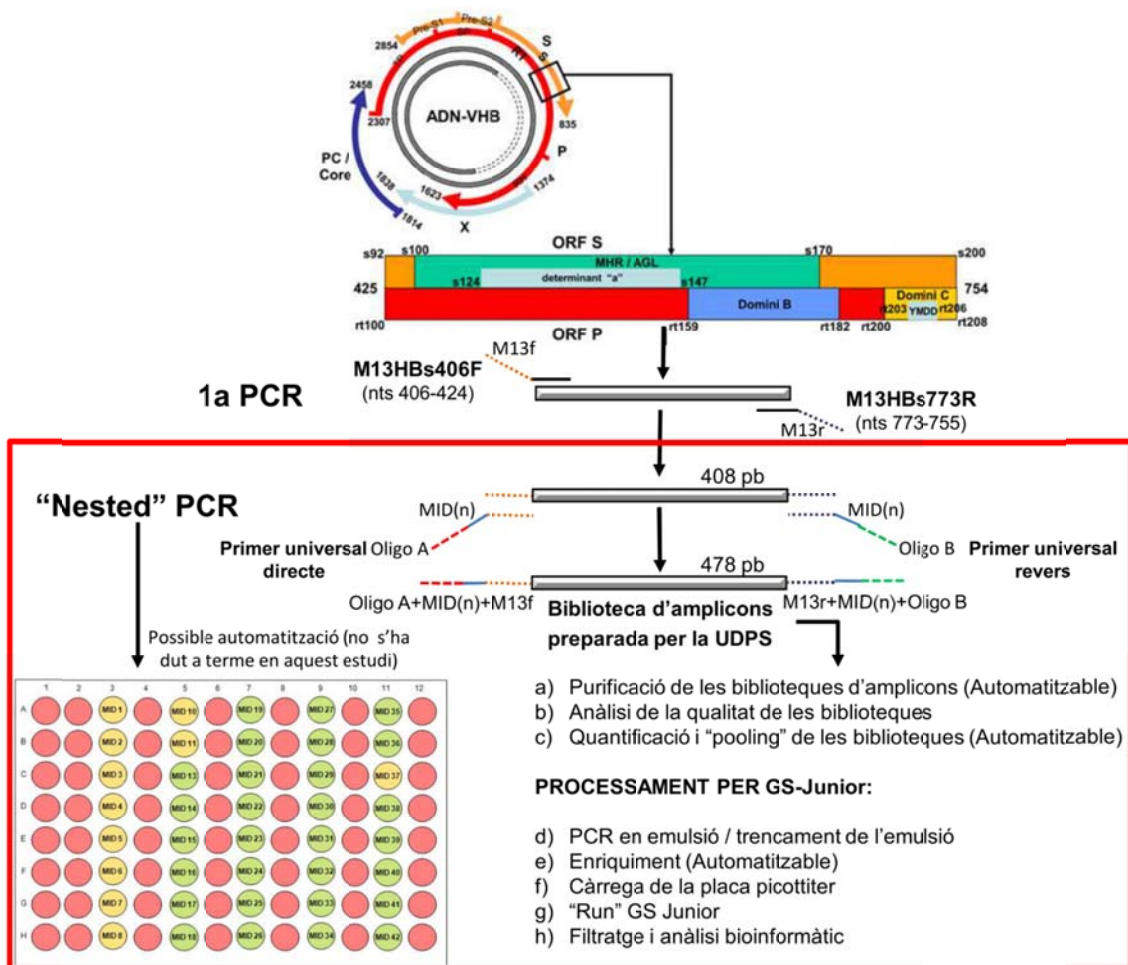


Figura 45: Esquema per l’obtenció i processament de les biblioteques d’amplicons d’aquest estudi. En la primera reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s’utilitzen uns “primers” específics de la seqüència motlle a amplificar [posicions respecte la diana única per EcoRI (59)]:

M13HBs406F: **GTAAAACGACGGCCAGTCTTCATCTGCTGCTATGC** [nucleòtids (nt) 406-424].

M13HBs773R: **AACAGCTATGACCATGTGTACAGACTTGGCCCCA** [nucleòtids (nt) 773-755].

Aquests “primers” contenen una seqüència específica per amplificar la regió del genoma que s’estudiarà (nts 425-754) i unes seqüències M13 (directa M13f i reversa M13r, en negreta) als extrems 5’. Aquestes seqüències permetran realitzar la “nested” PCR amb uns “primers” universals per qualsevol fragment d’ADN que interressi amplificar. Aquesta part universal i automatitzable del procés s’ha emmarcat en vermell. Aquests primers contenen les mateixes seqüències M13 que els primers específics a l’extrem 3’ per poder hibridar amb els amplicons obtinguts a la primera PCR. A continuació contenen un identificador únic [“Multiplex identifier” o MID(n)], que es una seqüència de 10 nucleòtids establerta pel fabricant i que s’utilitzarà durant l’anàlisi bioinformàtic per identificar la mostra a la que pertany cada “read”. Això implica que la “nested” PCR s’ha realitzat amb una parella de primers específica per cada mostra. Finalment a l’extrem 5’ contenen els adaptadors Oligo A i B, que permetran als amplicons

interaccionar amb els diferents primers i oligonucleòtids dels sistema de seqüenciació [veure 2.3.4.4.1. La tecnologia d'“Ultra-deep pyrosequencing” (UDPS)]. Després es continua amb els diferents passos del processament normal de les biblioteques d'amplicons per GS-Junior.

El nou sistema de filtratge dels “reads” obtinguts també s'ha dut a terme en l'entorn de programació de codi obert R (601), utilitzant les llibreries Bioconductor (619) i Biostrings (620) per l'alineament dels “reads” obtinguts amb el patró de referència. El sistema consisteix en els següents passos:

- En primer lloc s'ha dut a terme el demultiplexat dels “reads” per separar-los segons la mostra a la que pertanyen a partir de les seqüències MID. Es tolera un màxim d'una diferència en la identificació del MID. Després es separa segons la seqüència M13 directa i reversa (veure figura 45). Aquí es toleren fins a 4 diferències. Tot seguit es separen els “reads” per “primers” específics. Aquí es toleren entre 2 i 3 diferències. Aquests passos es duen a terme mitjançant l'alineament de cada “read” amb la seqüència de cada un dels “primers” utilitzats. Finalment s'obté un fitxer fasta per cada combinació de MID directa i reversa i “primer” específic, completant el demultiplexat de mostres inicials. A mesura que es va demultiplexant es van eliminant les seqüències que permeten la identificació.
- A continuació es porta a terme un filtre de qualitat de les seqüències.
 - S'eliminen els “reads” que no cobreixen la longitud sencera de l'amplicó.
 - S'eliminen totes les seqüències amb indeterminacions (N).
 - Tot seguit, es col·lapsen tots els “reads” que corresponen a una mateixa seqüència en un sol haplotip associant-li la freqüència amb que s'observa. Cada haplotip correspon a una variant concreta de la quasiespècies del VHB.
 - Els haplotips representats per una sola seqüència s'eliminen, atès que no serà possible distingir-los d'un artefacte degut a les PCR o al propi procés de seqüenciació.
 - Els diferents haplotips s'alineen per parelles respecte l'haplotip dominant, o una referència externa, i s'eliminen aquells haplotips que presenten insercions-deleccions (indels) respecte l'haplotip dominant o la referència externa.
- Tots els haplotips amb freqüències no inferiors al 0,1% en les cadenes directa i reversa es confronten. Els haplotips comuns en ambdues cadenes es consideraran haplotips de consens, havent eliminat la majoria d'errors introduïts en el procés. La freqüència final de cada haplotip resulta de la suma de “reads” observats en les cadenes directa i reversa.

Els controls realitzats amb ADN plasmídic en l'estudi on es descriu aquest sistema de filtratge (386) han permès estimar que els haplotips obtinguts per sobre del 0,25% del total tenen una elevada probabilitat de no ser erronis.

Anàlisi de la quasiespècies de pacients amb recurrència del VHB posttrasplantament: La

quasiespècies del VHB s'ha estudiat en 10 mostres de sèrum de quatre pacients obtingudes abans de l'OLT i després de la recurrència de la replicació viral [un amb HBsAg detectable i tres amb HBsAg indetectable (pacients 1 a 3)] amb nivells d'ADN-VHB suficients per poder amplificar la regió estudiada (límit de la sensibilitat de la "nested" PCR= 10^3 UI/mL). Aquestes 10 mostres s'han anomenat de l'A a la J, el moment en el que van ser obtingudes i els seus nivells d'ADN-VHB es mostren a la figura 46.

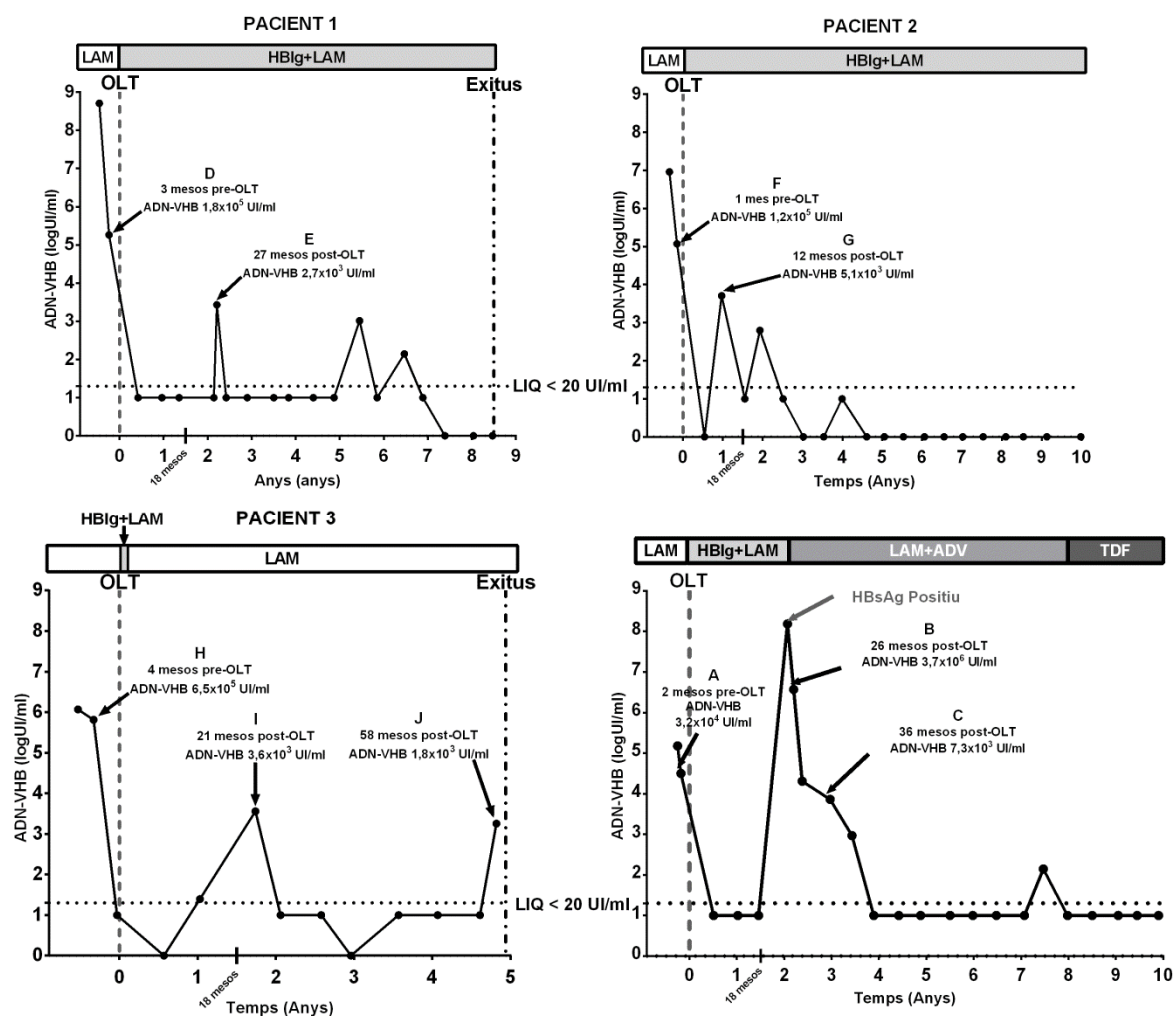


Figura 46: Evolució dels nivells d'ADN-VHB durant el seguiment dels pacients amb recurrència del virus de la hepatitis B (VHB) amb antigen de superfície del VHB (HBsAg) indetectable (pacients 1, 2 i 3) i en el pacient amb recurrència amb HBsAg detectable (s'indica el moment a partir del qual es va detectar de nou el HBsAg). S'indiquen els diferents tractaments que han rebut els pacients al llarg del seu seguiment així com el moment en el que s'ha obtingut cada una de les mostres analitzades per UDPS. LAM=lamivudina, ADV=adefovir, HBIg=immunoglobulines contra el VHB, TDF=tenofovir, LIQ=Límit inferior de quantificació.

S'han analitzat un total de 62.465 "reads" d'aquestes 10 mostres obtinguts mitjançant la plataforma GS-Junior (Roche), que utilitza la mateixa tecnologia que la GS-FLX, utilitzada en el primer estudi, amb un protocol més simple però també amb un rendiment inferior [aproximadament 1/10 dels "reads" que la plataforma GS-FLX és capaç de generar (472)].

En general, les mostres obtingudes en abans de l'OLT tenien càrregues virals elevades (entre $3,2 \times 10^4$ i $6,5 \times 10^5$) i una cobertura d'entre 1909 i 9978 "reads", cosa que garanteix la detecció de com a mínim les principals variants de la quasiespècies viral abans del trasplantament. A més, per reduir en la màxima mesura possible el biaix dels resultats s'ha utilitzat l'enzim amb activitat "proofreading" Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), té un rang d'error de un de cada 2,5 milions de pb [informació proporcionada pel fabricant (621)]. No obstant, la composició de la quasiespècies d'aquestes mostres no ha permès preveure la recurrència del VHB després de l'OLT. Els canvis d'aa als ORF P i S més rellevants observats en aquest estudi es resumeixen en les taules 1 i 2 de l'annex 2:

En el cas del pacient amb recurrència amb HBsAg detectable, es van observar proporcions relativament elevades (19%) de variants amb el canvi d'aa sP120T/rtT128N relacionada tant amb escapament al sistema immunitari com amb un paper compensatori de canvis relacionats amb la resistència a LAM (523). Aquest mateix canvi va ser detectat en la variant dominant després de l'OLT, però combinat amb altres canvis relacionats amb la resistència al tractament amb NUCs i amb escapament immunitari que no es van detectar abans del trasplantament (encara que a pesar d'això, el HBsAg seguia sent detectable després de l'OLT): sP120T-sE164D-sI195M / rtT128N-rtV173L-rtL180M-rtM204V.

En el cas dels tres pacients amb recurrència del VHB sense HBsAg detectable, aquesta pot haver-se donat per motius diferents en cada un dels pacients. Per una banda en el pacient 2, s'ha observat una selecció massiva de variants rtA181T/sW172* (superior inclús a la observada en el seguiment longitudinal de l'estudi anterior) després de l'OLT, i a més també es va produir un canvi en el genotip dominant a la quasiespècies del VHB estudiat per filogènesi de les seqüències dels "reads" obtinguts (va passar de D abans de l'OLT a A després). Aquesta variant pot produir canvis estructurals profunds en les SVP "in vitro" (438), en les quals es basa la detecció del HBsAg per kits comercials (142) suggerint que la no detecció del HBsAg podria ser deguda a la incapacitat dels mètodes de diagnòstic disponibles per detectar aquesta variant. En el cas dels pacients 1 i 3 les mostres obtingudes 27 (mostra E) i 21 (mostra I) mesos després del trasplantament respectivament mostraven una clara dominància de la variant "wild-type" a la quasiespècies, i a més en el cas del pacient 1 també es va produir un canvi del genotip D abans del trasplantament a l'A després. Finalment en la mostra J del pacient 3, obtinguda gairebé cinc anys després del trasplantament, es va observar la selecció de variants amb múltiples canvis d'aa associats o potencialment associats a l'escapament immunitari en l'ORF S (sF93C-sM103I-sF134N-sP142R-sL175S i sF93C-sM103I-sF134N-sP142R-sS174N-sL175S).

Aquests canvis, en alguns casos molt rellevants com fins i tot canvi de genotip viral, entre la quasiespècies d'abans i després de l'OLT podrien explicar-se per una infecció de "novo" després del trasplantament, o que la infecció estigués al fetge trasplantat i es reactivés ajudada pel tractament immunosupressor que rebien els pacients per evitar el rebuig del seu nou fetge. Aquesta possibilitat s'ha considerat molt improbable, tenint en compte que cap dels pacients va rebre un fetge que fos positiu per anti-HBc. Per altra banda, el tractament profilàctic que estaven rebent els pacients (figura 46) feia molt difícil que s'establís una nova infecció per VHB. Així doncs, el més probable és que les variants dominants a la quasiespècies després de l'OLT ja existissin a la quasiespècies que hi havia abans en proporcions per sota el nivell de sensibilitat de la tècnica d'UDPS, i la seva selecció pot haver estat propiciada per un efecte coll d'ampolla: en realitzar el trasplantament hepàtic es produeix una davallada sobtada de les poblacions virals presents a la quasiespècies del VHB. D'aquesta manera, entre les poques poblacions virals que queden, les que tenen una eficiència més alta per re-infectar el nou fetge i replicar-se en presència del tractament profilàctic seran les noves variants dominants a la quasiespècies de després de l'OLT. Aquesta mena de fenòmens ja han estat descrits després del trasplantament hepàtic en pacients infectats per VHC (622). També poden haver contribuït a la generació de variants diferents mecanismes endògens del propi hoste com la hipermutació de guanina a adenina mediada per l'enzim "apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G" (APOBEC3G), un mecanisme de defensa de l'hoste que el VHB pot aprofitar per enriquir la seva quasiespècies en variants resistents al tractament antiviral, com en el cas del canvi rtA181T/sW172* (371,623) (canvis de nt TGG → TGA en l'ORF S i GCT → ACT a l'ORF P, que afecten els nts 668 a 672 del genoma del VHB segons la seqüència de referència AM282986) seleccionat de manera massiva pel pacient 2. Aquesta hipòtesi concorda amb els resultats de l'estudi de la diversitat de la quasiespècies del VHB en les mostres recollides entre un i quatre mesos abans del trasplantament i entre 12 i 27 mesos després (figura 47).

La diversitat de la quasiespècies viral s'ha avaluat segons tres paràmetres diferents, cada un d'ells explica un aspecte determinat de la seva variabilitat: L'entropia de Shannon normalitzada (S_n) mesura la diversitat de la quasiespècies tenint en compte la quantitat d'haplotips o variants que s'hi han trobat i la freqüència relativa entre elles, però no té en compte les diferències (nombre de canvis) entre aquestes variants. La freqüència de mutació (M_f) mesura l'heterogeneïtat genètica respecte la variant dominant a la quasiespècies (màster). Finalment la diversitat nucleotídica (P_i) mesura també l'heterogeneïtat genètica, però en aquest cas com la mitjana de canvis de nt per posició entre cada parella de variants. El càlcul d'aquestes variables s'ha realitzat computacionalment, en l'ambient de programació de codi lliure R (601) tal i com s'ha descrit en publicacions anteriors del grup del doctorand (383,386,624). En general

s'observa que en les quasiespècies analitzades en períodes de temps semblants després de l'OLT (entre 12 i 27 mesos després), els valors d'aquests tres paràmetres tendeixen a confluïr en valors relativament baixos respecte els valors calculats abans del trasplantament (figura 47). Així doncs, després del trasplantament hi ha una disminució tant en nombre com en heterogeneïtat dels haplotips (variants genètiques) presents a la quasiespècies. Això es podria explicar per un efecte coll d'ampolla sobre la diversitat de la quasiespècies del VHB tal com s'ha descrit abans.

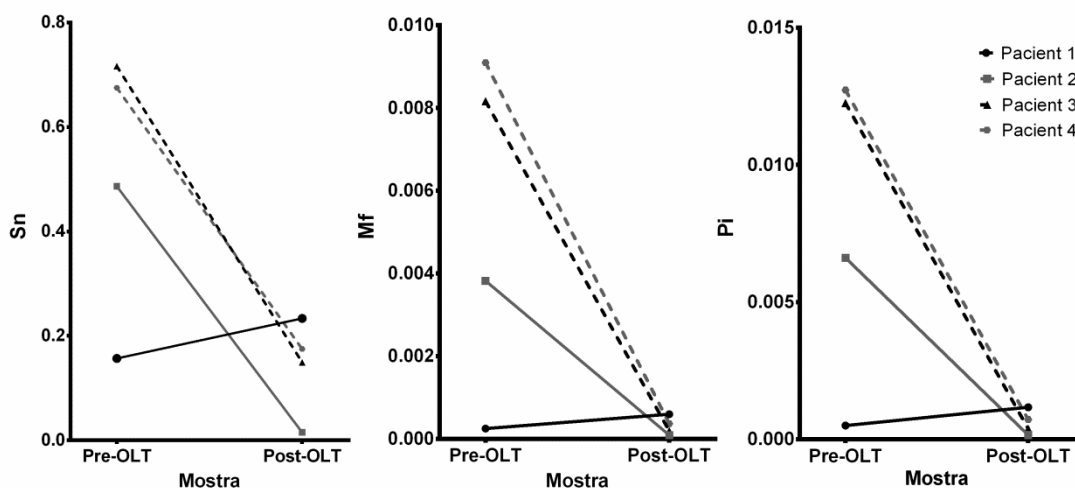


Figura 47: Diversitat de la quasiespècies del virus de la hepatitis B (VHB) a nivell de nucleòtids en la regió estudiada, en mostres obtingudes abans del trasplantament hepàtic ortotòpic (OLT) i entre 12 i 27 mesos després. En aquestes mostres la diversitat s'ha calculat mitjançant l'entropia de Shannon normalitzada (Sn), la freqüència de mutació (Mf) i la diversitat nucleotídica (Pi). En les gràfiques els pacients 1, 2 i 3 són els que van experimentar recurrència de la replicació viral amb HBsAg indetectable, mentre que el pacient amb recurrència amb HBsAg positiu s'ha indicat com a pacient 4. Aquesta figura correspon a la figura 6 de l'article.

Finalment, alguns dels canvis que han experimentat les quasiespècies dels quatre pacients estudiats després del trasplantament suggereixen mecanismes utilitzats pel VHB per la recurrència postrasplantament:

En primer lloc, en les mostres obtingudes 21 i 27 mesos després de l'OLT en els pacients 1 i 3, que van experimentar recurrència del VHB amb HBsAg indetectable, la variant dominant a la quasiespècies era la "wild-type", que no tenia canvis que justificassin perquè el tractament amb HBIG+LAM en el pacient 1 i amb LAM en el 3 no va poder evitar la infecció i posterior replicació del VHB. Una possible explicació podria ser que aquestes mostres haguessin estat obtingudes en un període finestra de la re-infecció del nou fetge (142), com el que s'ha descrit en casos transmissió del VHB en donacions de sang. En aquest període l'ADN-VHB ja és detectable però el HBsAg encara no s'ha pogut produir en prou quantitat com per ser-ho. Tot i així, en teoria aquest període dura uns dos mesos després de la infecció i aquestes mostres es van recollir aproximadament dos anys després del trasplantament, per tant estan massa

allunyades en el temps de l'OLT per poder ser considerades dins el període finestra. Una explicació alternativa podria ser que la baixa replicació i la manca de detecció de HBsAg sigui deguda a alteracions en altres regions del genoma del VHB, com per exemple la regió del BCP/EN2 que controla l'activitat dels promotors preS/S. Les variants amb canvis en aquesta regió són més comunes en pacients immunosuprimits i trasplantats que en els pacients amb HBC (374) i els nivells relativament reduïts d'ADN-VHB podrien ser deguts a la regulació a la baixa de la replicació viral pels canvis en aquesta regió (376).

En segon lloc, cap pacient va seleccionar variants amb mutacions al determinant "a" entre els 12 i els 27 mesos després del trasplantament, per tant la variant "wild-type" d'aquest epítov va ser la responsable de la re-infecció del fetge trasplantat a pesar de la profilaxi amb HBIg. Això qüestiona el paper de la immunoprofilaxi en la prevenció de la re-infecció del nou fetge, ja que sembla indicar que en aquest cas la HBIg no exerceix cap pressió sobre l'ORF S. Per altra banda, el fet que no es seleccionin variants en el determinant "a" a pesar de l'efecte coll d'ampolla, posa en relleu la importància d'aquest motiu per la infectivitat del VHB, com s'ha comentat prèviament (147,262), la variant "wild-type" en aquest motiu probablement re-infecta el nou fetge de manera més eficient que qualsevol altre.

L'anàlisi del genotip per filogènesi dels "reads" obtinguts ha revelat que després de l'OLT es van seleccionar genomes virals de genotip A després del trasplantament en els pacients 1 i 2 que abans mostraven el genotip D, la qual cosa reforça la hipòtesi que el genotip A del VHB és menys sensible al tractament amb LAM que el D (445). L'efecte coll d'ampolla sobre la diversitat de la quasiespècies del VHB pot haver contribuït a la selecció d'un genotip diferent després de l'OLT, degut a la reducció del nombre de genomes de genotip D que dominaven la quasiespècies abans del trasplantament, molt més dràstica que els de genotip A. L'anàlisi filogenètic per determinar el genotip s'ha realitzat a partir de patrons genoma complet del VHB descarregats de la base de dades GenBank (391) i representatius dels genotips A a J del VHB, als que se'ls ha retallat la seqüència de 330 pb analitzada en aquest estudi contra els que s'ha alineat la seqüència màster (la seqüència dels haplotips més representats a cada quasiespècies) de cada mostra i les seqüències dels haplotips amb més d'un 2% de la seva seqüència diferent respecte la màster. Tot i que la regió analitzada en general separa correctament els principals genotips del VHB (figura 48) la interpretació d'aquesta filogènesi s'ha de realitzar amb cura ja que en utilitzar seqüències relativament curtes, no es pot descartar que la regió analitzada sigui diferent a la resta del genoma degut al subgenotip, el patró específic de mutacions de cada variant o recombinació intergenotípica, fenomen aquest darrer molt freqüent en el VHB (390) Així doncs, la selecció en favor del genotip A en pacients que reben LAM caldria que fos

confirmada en primer lloc en un grup més gran de pacients i en segments més grans del genoma del VHB, que codifiquessin proteïnes virals diferents.

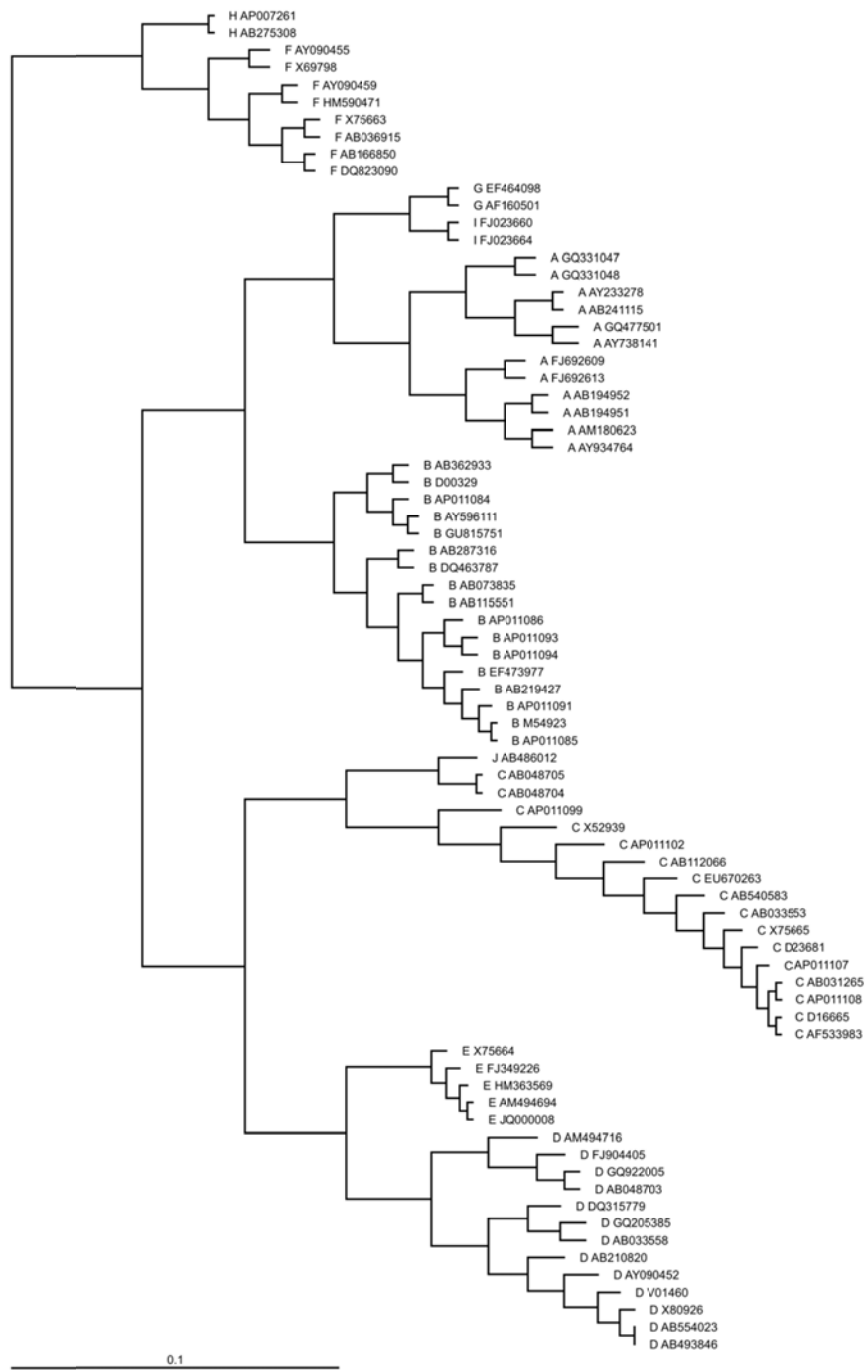


Figura 48: Filogènesi realitzada a partir de la seqüència de 330 pb (nucleòtids 425 a 754) del genoma del VHB analitzada en aquest estudi, que s'ha retallat de 78 dels patrons de genoma complet descarregats de la base de dades Genbank i s'han utilitzat com a patrons pel genotipatge del VHB en aquest estudi. Cada un dels patrons s'indica amb el seu numero d'accés a Genbank, precedit pel genotip del VHB al que correspon. En general els principals genotips del VHB (A a H) es separen entre ells correctament.

4.3.3. Conclusions:

1. Amb LAM+HBIg o LAM en monoteràpia, la supervivència a llarg termini dels pacients és excel·lent i el risc de recurrència és baix, tot i que en un percentatge important de casos mostren nivells detectables d'ADN-VHB durant el seguiment, la qual cosa demostra la re-infecció del fetge trasplantat pel VHB i suggereix la importància de la profilaxi continua amb antivirals orals per controlar aquesta re-infecció.
2. El trasplantament hepàtic causa un efecte de coll d'ampolla sobre les poblacions de variants genètiques que formen la quasiespècies del VHB, que dona lloc a canvis significatius en la composició de la quasiespècies del VHB en cas de recurrència post-trasplantament.
3. La recurrència post-trasplantament del VHB podria estar relacionada amb canvis a regions del genoma viral diferents de les que codifiquen les dianes d'acció dels tractaments profilàctics. Aquests canvis podrien arribar a ser des de substitucions de nt o aa fins a recombinacions de diferents genotips del VHB, que podrien tenir implicacions en la severitat de la malaltia hepàtica. La manera ideal de confirmar aquests fenòmens seria seqüenciar segments del genoma del VHB el més grans possible, que incloguessin seqüències codificants de diferents proteïnes virals.
4. La re-infecció del fetge per la variant "wild-type" del determinant "a" suggereix que aquesta variant és la més eficient per re-infectar el nou fetge i qüestiona el paper profilàctic de la HBIg per evitar la recurrència del VHB.

4.4. ARTICLE ORIGINAL:

Buti M, Tabernero D, Mas A, Homs M, Prieto M, Rodríguez-Frías F, et al. Hepatitis B virus quasispecies evolution after liver transplantation in patients under long-term lamivudine prophylaxis with or without hepatitis B immune globulin. *Transpl Infect Dis.* 2015;17(2):208–20.

DOI: 10.1111/tid.12360

En no estar publicat en una revista d'accés obert aquest article en el seu format publicat no es pot incloure en aquesta tesi. No obstant, a l'annex 2 es troba una captura de la primera pàgina i les taules més rellevants.

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ:

El virus de l'hepatitis B (VHB) és un patògen hepàtic que causa infeccions agudes i cròniques i representa un important problema de salut global, amb més de 240 milions de persones portadores cròniques del seu antígen de superfície (HBsAg). Aquests individus tenen un alt risc d'experimentar cirrosi hepàtica i hepatocarcinoma (HCC) (475,485). Actualment hi ha set tractaments antivirals aprovats contra l'hepatitis B crònica (HBC): dos formulacions d'interferó injectables i cinc tractaments de la família dels anàlegs de nucleòtids/nucleòsids (NUCs), que avui en dia són l'opció de tractament contra l'HBC més àmpliament utilitzada (484,499,625,626). Els NUCs actuen directament sobre el domini de la transcriptasa reversa (RT) de la polimerasa viral i inhibeixen el pas del seu ARN pregenòmic (pgARN) a l'ADN relaxat circular (rcADN) (429). Malgrat el seu potent efecte inhibitori sobre la replicació del VHB, aquests tractaments no eviten la formació de la forma episòmica ADN circular covalentment tancat (cccADN) (300,301), que probablement depèn sobretot d'enzims relacionats amb la reparació de l'ADN genòmic de la cèl·lula hoste (299). A causa d'això durant el tractament amb NUCs l'aclariment del cccADN, succeeix de manera lenta (506,509) i per tant aquest episoma a partir del que es transcriuen tots els ARN virals (17) persisteix durant períodes de temps llargs en el nucli dels hepatòcits infectats (506,509,517,594), amb una alta probabilitat de reactivació de la replicació viral en retirar els NUCs. Per això aquests tractaments es solen administrar durant un període de temps indefinit (potencialment tota la vida del pacient) i només es s'aturen en casos molt concrets, tot i que es desconeixen els seus efectes acumulatius sobre la salut dels pacients de la seva administració indefinida (484,499,625,626).

L'absència de capacitat de correcció/edició ("proofreading/editing") 3'-5' de la polimerasa viral sembla principal causa de la seva estructura en quasiespècies (364,365), una unitat de selecció formada per un espectre de poblacions o variants genètiques no idèntiques tot i que relacionades entre elles (veure 2.3.1. Estructura en quasiespècies de les poblacions del VHB). L'exposició del VHB a NUCs pot seleccionar al llarg del temps variants genètiques amb canvis en el domini RT de la polimerasa viral que li confereixen susceptibilitat reduïda a l'efecte inhibitori d'aquests tractaments (resistència) (459).

Les variants resistents al tractament antiviral amb NUCs normalment es troben presents en nivells indetectables per les tècniques de diagnòstic convencionals [seqüenciació directa d'ADN, tècniques d'hibridació reversa o fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP)], però la seva proporció augmenta molt durant el rebot virològic (VBK) causat pel fracàs del tractament antiviral que es determina per l'augment de la concentració de l'ADN del

VHB en sèrum (ADN-VHB) \geq 1 logaritme d'unitats internacionals per mil·lilitre (UI/mL) durant el tractament antiviral (484). La replicació continuada sota la pressió selectiva dels NUCs pot causar l'acumulació de mutacions de resistència secundàries, que augmenten la capacitat replicativa de les variants resistents al tractament antiviral fins a nivells similars o inclús superiors a la variant sense mutacions de resistència als tractaments antivirals ("wild-type") i poden donar lloc a exacerbacions de la malaltia hepàtica (523–527). A més, degut a l'alt grau de solapament entre les diferents pautes obertes de lectura (ORFs) del genoma del VHB (58–60), la regió que codifica la proteïna de superfície curta (SHBs) en el ORF de les proteïnes de superfície (S) es solapa en la mateixa seqüència de nucleòtids (nt) que codifica el domini RT a l'ORF de la polimerasa viral (P) (veure 2.1.2.1. Les pautes obertes de lectura i proteïnes virals). Per tant les variants genètiques resistents o amb baixa sensibilitat al tractament amb NUCs també poden presentar alteracions a la seqüència de la SHBs que poden donar lloc a la unió reduïda dels anticossos contra el HBsAg (anti-HBs) a les proteïnes de superfície o causar-hi l'aparició de codons stop prematurs (veure 2.3.3.3. Variants genètiques de l'ORF S). La selecció de variants resistents a NUCs és especialment greu en pacients amb trasplantament hepàtic per infecció per VHB, que solen rebre immunoglobulines contra el virus de la hepatitis B (HBIG) acompanyades de NUCs com a profilaxi per evitar la reinfecció del nou fetge (552). Així, en aquests pacients la selecció de variants amb resistència a NUCs pot causar la recurrència de la infecció viral (433,561). La replicació de variants genètiques resistents al tractament amb NUCs fa que aquestes infectin noves cèl·lules i s'emmagatzemin en el seu nucli mitjançant el cccADN (546,547). Això dificulta molt el tractament de rescat dels pacients que han experimentat prèviament la fallada d'un determinat tractament antiviral degut al fenomen de les resistències creuades (veure 2.5.1.4. Resistències creuades).

En la present tesi s'han estudiat les variants genètiques de la quasiespècies del VHB i els canvis que experimenten les seves proporcions relatives en resposta a la pressió selectiva dels NUCs i que porta a la selecció de variants resistents a aquests tractaments antivirals. Seguint aquest plantejament, s'ha estudiat la regió del genoma on es troben els determinants virals rellevants pels fenòmens de resistència a aquests tractaments: el centre actiu del domini RT de la polimerasa viral i les seqüències adjacents que codifiquen els seus dominis funcionals en l'ORF P. Aquests dominis es solapen a la mateixa seqüència de nt amb la regió que codifica la principal regió epitòpica de les proteïnes de superfície, el bucle antigènic (AGL) de la seva regió hidrofílica principal (MHR) en l'ORF S. La composició de la quasiespècies en els diferents moments del tractament antiviral s'ha analitzat mitjançant tècniques de seqüenciació massiva basades en "Ultra-deep pyrosequencing" (UDPS), capaces de quantificar les proporcions fins i tot de les variants minoritàries en proporcions extremadament baixes (inferiors al 1%) a la quasiespècies del VHB, com en les que solen estar les variants genètiques resistents als NUCs.

En els dos estudis que componen aquesta tesi, aquesta regió s'ha estudiat en dos grups de pacients en diferents estadis de la malaltia hepàtica causada per la infecció per VHB:

- En el primer estudi s'ha analitzat la composició de la quasiespècies basal (abans de rebre qualsevol tractament amb NUCs) en un grup de quatre pacients amb HBC. En un d'ells, que va presentar fallada al tractament seqüencial amb diversos NUCs [lamivudina (LAM), adefovir (ADV) i entecavir (ETV)], es va analitzar la quasiespècies abans i després d'aquests tractaments.
- En el segon estudi es va analitzar la quasiespècies d'un grup de pacients amb una progressió de la malaltia hepàtica més severa. En aquest estudi es va partir d'un grup inicial de 29 pacients que van rebre trasplantament hepàtic ortotòpic (OLT) per malaltia hepàtica en etapa terminal (ESLD), inclosos en un estudi multicèntric aleatoritzat previ (615), que van rebre profilaxi post-trasplantament amb LAM en monoteràpia i/o en combinació amb HBIg (LAM+HBIg). D'aquest grup inicial s'ha estudiat la quasiespècies del VHB en quatre pacients que van presentar recurrència de la replicació viral (un amb HBsAg detectable i tres amb HBsAg indetectable) amb nivells d'ADN-VHB suficients per poder amplificar la regió estudiada (límit de la sensibilitat de la "nested" PCR= 10^3 UI/mL).

En estudis previs als inclosos en aquesta tesi (424,590–593), la tecnologia d'UDPS ha estat capaç de quantificar variants genètiques del VHB en proporcions extremadament baixes (habitualment al voltant del 1% de la quasiespècies o inclús inferiors). Per tant en aquesta tesi s'ha partit de la hipòtesi de que aquesta metodologia pot ser aplicada a l'estudi de les dinàmiques de les variants de la quasiespècies del VHB amb canvis que porten a desenvolupar resistència al tractament antiviral amb NUCs i/o a l'escapament al sistema immunitari a través de canvis en epítops de la SHBs. Així doncs, el primer objectiu ha estat desenvolupar metodologies que permetessin aquest anàlisi amb uns resultats fiables tenint en compte les fonts d'error del sistema d'UDPS. Un cop desenvolupades aquestes metodologies, s'han estudiat les dinàmiques de les variants resistents al tractament amb NUCs per intentar predir l'evolució de la quasiespècies durant el transcurs del tractament antiviral abans de començar a rebre'l. D'aquesta manera es podria optimitzar la seva eficàcia segons la quasiespècies de cada pacient; així com estudiar mecanismes de selecció de variants concretes i relacions entre variants dins una mateixa quasiespècies.

5.1. MÈTODES D'ESTUDI DE LA COMPOSICIÓ DE LA QUASIESPÈCIES:

Tal com s'ha explicat abans, en els estudis d'aquesta tesi s'han utilitzat tècniques de seqüenciació massiva o de nova generació (NGS) basades en UDPS. Tanmateix existeixen

diferents tècniques per la caracterització o genotipatge de les variants de la quasiespècies del VHB que s'utilitzen de manera convencional per estudiar la quasiespècies del VHB. El doctorand ha participat en diferents estudis on s'han utilitzat algunes d'aquestes tècniques abans que el seu grup tingués accés a les noves tecnologies d'UDPS. En aquest apartat es comentaran alguns dels resultats obtinguts en aquests estudis (dels que es pot veure la referència a l'annex 3), realitzats durant el transcurs d'aquesta tesi, així com els motius pels que s'han descartat les tècniques utilitzades en favor de la UDPS en aquesta tesi. Per altra banda també es comentaran alguns aspectes de la posada a punt de les metodologies d'UDPS utilitzades en els dos estudis de la tesi.

5.1.1. Estudi de la quasiespècies per tècniques convencionals:

Les tècniques genotípiques convencionals per la detecció de variants genètiques amb mutacions resistents a l'acció dels NUCs es basen sobretot en la determinació de mutacions concretes del domini RT de la polimerasa viral, fonamentalment per mitjà hibridació, RFLP i la seqüenciació d'amplicons de la regió a estudiar generats per PCR (directa o poblacional i amb un pas previ de clonatge molecular) (459).

5.1.1.1. Tècniques basades en hibridació: la hibridació reversa:

Durant el transcurs d'aquesta tesi, el doctorand ha participat en dos estudis de la quasiespècies del VHB basats en les tècniques genotípiques d'hibridació, els resultats dels quals estan relacionats amb els dos estudis que formen part d'aquesta. Les tècniques d'hibridació utilitzades en aquests dos estudis es basen en les tècniques comercials d'hibridació reversa en sondes d'oligonucleòtids INNO-LiPA [Fujirebio (Innogenetics), Ghent, Bèlgica], que permeten detectar canvis d'aminoàcid (aa) o nt preestablerts presents en un 5-10% de les variants de la quasiespècies (446).

En el primer dels estudis previs (445) es va utilitzar el kit comercial INNO-LiPA HBV Genotyping Assay per determinar la prevalença dels genotips del VHB en un grup de 103 pacients amb HBC. A més es van seleccionar 22 pacients (17 en tractament antiviral i cinc sense tractament) d'aquest grup per fer un estudi longitudinal retrospectiu de tres anys. Aquest assaig té un nivell de sensibilitat per la detecció de polimorfismes associats al genotip viral més elevat que la tècnica de referència per determinar el genotip del VHB, la seqüenciació directa d'amplicons, habitualment de la regió de solapament entre els ORFs P i S (una regió que inclou la que s'ha estudiat en els dos estudis d'aquesta tesi) pel seu posterior anàlisi filogenètic.

Gràcies a aquest elevat nivell de sensibilitat, es va detectar una proporció de co-infeccions per diferents genotips del VHB més elevada del que s'havia descrit prèviament per RFLP (396). A més, en l'estudi longitudinal es va observar que en els pacients no tractats no variava el genotip al llarg del seguiment, mentre que en els tractats hi havia una tendència a seleccionar variants genètiques de genotip A al llarg del seguiment, principalment co-infectant amb variants del genotip majoritari que es mostrava al principi del seguiment (que en la majoria de casos era el genotip D). En el segon estudi d'aquesta tesi, en pacients amb trasplantament hepàtic que reben LAM com a profilaxi també s'ha observat aquesta tendència a seleccionar variants de genotip A durant la reactivació post-trasplantament. Tanmateix, la hibridació reversa no va permetre determinar la seqüència dels genomes virals presents en les diferents mostres analitzades durant aquest estudi longitudinal, i per tant no va permetre esbrinar si aquesta selecció del genotip A era deguda a una variant amb una combinació concreta de canvis d'aa seleccionada durant el tractament antiviral, que podria haver afectat a l'especificitat de l'assaig d'hibridació reversa per determinar el genotip. Per aquest motiu, va caldre confirmar els resultats determinant el genotip de variants genètiques individuals presents a la mateixa mostra per clonatge molecular i seqüenciació.

En el segon dels estudis previs basat en tècniques d'hibridació reversa (460) es va avaluar la tercera versió del kit comercial INNO-LiPA DR, que permet detectar variants amb canvis d'aa al domini RT de la polimerasa viral prèviament associats a la resistència a ETV. Es van estudiar mostres de sèrum de 59 pacients amb HBC que no van respondre a diferents NUCs, incloent el pacient que va rebre tractament seqüencial amb LAM, ADV i ETV posteriorment analitzat per UDPS en el primer estudi d'aquesta tesi. De cada pacient es va analitzar una mostra en abans de rebre qualsevol tractament amb NUCs i després de la fallada de d'aquest tractament. En el cas del pacient que posteriorment es va analitzar per UDPS en el primer estudi de la present tesi, després del VBK amb ETV es va detectar per LiPA la mutació rtS202S/G (barreja de la variant "wild type" amb la mutant rtS202G). En el primer dels estudis per UDPS inclòs a la tesi s'ha observat que aquesta mutació també estava present en la variant dominant en la mostra analitzada després del rebot virològic amb ETV (mostra 4E), però combinada amb alteres mutacions en la mateixa variant: rtL180M-rtS202G-rtM204V-rtV207I (72,4% de la quasiespècies viral) entre les que destaca la rtV207I, que no s'havia relacionat prèviament amb la resistència a ETV i que tot i la seva elevada freqüència no es va detectar per LiPA perquè a la nova versió d'INNO-LiPA DR aquesta variant no estava inclosa, observació que de nou evidencia les limitacions d'aquest tipus de tecnologia

A partir de les dades observades al primer estudi per UDPS es pot formular la hipòtesi que la mutació rtV207I podria tenir un paper compensatori de la mutació de resistència primària a

NUCs rtM204V, ja que es selecciona preferentment amb aquesta mutació, i de fet, per tal de comprovar si la selecció simultània de les dos mutacions tenia lloc en altres pacients o era un fenomen característic del pacient estudiat, es va realitzar un anàlisi retrospectiu de la informació acumulada amb la primera versió de l'assaig INNO-LiPA DR, que incloïa aquestes dues mutacions (446). En versions posteriors d'aquest assaig la mutació rtV207I va ser retirada per donar cabuda en les tires de nitrocel·lulosa a altres sondes que semblaven més rellevants per la resistència a NUCs. Aquest anàlisi retrospectiu va suggerir que la compensació del canvi rtM204V per rtV207I és possible (tot i que requereix una confirmació fenotípica), ja que el 39% dels 50 pacients revisats tenien les dues mutacions tot i que no es podia demostrar que coexistissin en la mateixa variant. Aquests resultats evidencien les limitacions de les tècniques d'hibridació reversa en quant a l'espectre limitat de mutacions que pot detectar un sol assaig, les quals estan basades únicament en el coneixement actual de les mutacions que donen resistència als tractaments antivirals, però és incapaç de detectar noves mutacions associades a aquests tractaments. I de fet reforcen la rellevància de la metodologia basada en UDPS.

5.1.1.2. Anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP):

Les tècniques basades en RFLP tenen una sensibilitat comparable a les d'hibridació (al voltant del 5% de la quasiespecie), però no detecten directament la seqüència del genoma viral sinó tan sols mutacions d'interès (459). Així doncs les tècniques tampoc resulten adients per l'objectiu d'estudiar en profunditat la composició de la quasiespecie del VHB.

5.1.1.3. Seqüenciació directa d'amplicons o amb un pas previ de clonatge molecular:

La seqüenciació directa o poblacional es basa generalment en l'automatització del mètode de terminadors de cadena o mètode de Sanger (452), que permet determinar seqüències de molècules d'ADN prèviament amplificades per reacció en cadena de la polimerasa (PCR), és a dir amplicons, d'entre 300 i 900 pb (453). Aquesta tècnica genera una única seqüència formada pels nt que es troben en una proporció $\geq 20\%$ en cada posició de la regió d'interès seqüenciada (459). Així doncs, la informació sobre la quasiespecie del VHB que proporciona és limitada, perquè en donar lloc a una seqüència que és la mitjana de la de les variants genètiques més representades a la quasiespecie no és capaç de determinar la seqüència de variants individuals de la quasiespecie, i fins i tot pot donar-se el cas que la seqüència que es genera no correspongui a cap de les variants de l'espectre de la quasiespecie (370). Aquesta tècnica és adequada per detectar les mutacions presents en variants majoritàries de la quasiespecie en una proporció $\geq 20\%$.

Durant el transcurs d'aquesta tesi, el doctorand ha participat en un estudi (604) amb 41 pacients tractats amb ADV o LAM+ADV en el que abans del tractament es va caracteritzar per seqüenciació directa marcadors virològics per predir la no resposta primària al tractament amb ADV i la possible selecció de variants resistents a NUCs durant el tractament. Mitjançant aquesta tècnica es va determinar que entre altres característiques virològiques, la detecció del canvi d'aa associat al subgenotip A2 rtL217R en pre-tractament està potencialment associat a la no resposta a ADV (la seva sensibilitat de variants amb aquest canvi a aquest fàrmac ha de ser determinada mitjançant un estudi fenotípic). Tanmateix, en el mateix estudi també es va detectar cinc mutacions addicionals que només es seleccionaven durant el tractament, entre elles rtS219A, present en tres pacients amb resposta virològica parcial al tractament [definida a l'estudi com a disminució dels nivells d'ADN-VHB per sota les 10.000 còpies/mL (aproximadament 1700 UI/mL), però persistentment per sobre del límit de quantificació de la PCR a temps real utilitzada (500 còpies/mL, aproximadament 85 UI/mL)]. Tot i la possible rellevància d'aquestes mutacions juntament amb rtL217R, no va ser possible analitzar si estaven lligades o no en una mateixa variant per seqüenciació poblacional.

En aplicar un pas previ de clonatge molecular a la seqüenciació d'amplicons, es pot obtenir la seqüència de variants individuals de la quasiespècies i per tant determinar-ne la seva composició real. Per això aquesta tècnica era la referència per l'estudi de la composició de la quasiespècies del VHB en el moment en el que es va iniciar aquesta tesi i per tant es va utilitzar per comprovar les metodologies basades en UDPS desenvolupades en el primer i segon estudis.

En el primer estudi inclòs a la tesi es va realitzar la comprovació per clonatge de les variants observades per UDPS en la mostra obtinguda després de la fallada del tractament amb ETV (mostra 4E), en la que es van observar proporcions molt elevades de variants que acumulaven varis canvis d'aa associats a la resistència a ETV i LAM. Es va analitzar la seqüència de 23 clons i es va comparar amb les 23.249 seqüències obtingudes per UDPS, una diferència de mostreig molt important (1:1000). Tanmateix l'objectiu de l'experiment de clonatge era confirmar la presència dominant de la variant rtL180M-rtS202G-rtM204V-rtV207I detectada amb una freqüència del 72,4% per UDPS després del rebot virològic amb ETV, el qual es va aconseguir: per clonatge molecular es va detectar aquesta variant en el 65% de les seqüències obtingudes. A més també es van detectar dos de les variants amb combinacions de canvis d'aa relacionats amb la resistència a ETV detectades amb més freqüència per UDPS rtI169T-rtV173L-rtL180M-rtM204V i rtL180M-rtM204V. Les proporcions diferents de cada variant obtingudes per clonatge i UDPS es poden associar a la gran diferència de mostreig de les dues tècniques. Així per obtenir uns resultats quantitius comparables entre UDPS i clonatge,

s'haurien d'haver seqüenciat 1000 vegades la quantitat de clons seqüenciats en l'estudi inclòs en aquesta tesi, una tasca inabordable en quant al volum de feina, el temps i el cost econòmic que suposa.

5.1.2. Estudi de la quasiespècies per tècniques basades en seqüenciació massiva:

El gran avantatge de les tècniques de NGS sobre totes les que s'han comentat anteriorment és que permeten l'anàlisi clonal i en paral·lel de la seqüència de milers o inclús milions de molècules d'ADN (453,454). Aquestes tècniques, doncs, permetrien un mostratge molt més ampli de variants genètiques individuals de la quasiespècies del VHB que el que es podria obtenir per clonatge i seqüenciació en una sola carrera de seqüenciació. Això fa possible caracteritzar el perfil de mutacions d'aquestes variants individuals i les seves freqüències relatives dins la quasiespècies, fins i tot en variants que es troben en unes freqüències molt més baixes que les de les variants detectades per les altres tècniques comentades fins ara. A més proporcionaria informació substancial i acurada sobre la seva variabilitat de la quasiespècies viral. Això és de gran utilitat per buscar variants genètiques amb mutacions relacionades amb la resistència a NUCs abans de rebre un tractament antiviral i quantificar-ne la proporció. Per aquest motiu en els estudis que componen aquesta tesi es va optar per utilitzar aquestes tècniques.

5.1.2.1. Elecció de la plataforma de seqüenciació massiva pels estudis d'aquesta tesi:

Donada la diversitat de plataformes i tecnologies de seqüenciació massiva cal escollir aquelles amb unes característiques tecnològiques i de generació de dades que siguin més adequades pel projecte que es pensa dur a terme. Per tal de caracteritzar de la manera més completa possible el domini RT de les variants genètiques analitzades calia fer un anàlisi per files. Entenem anàlisi per files com l'anàlisi de cada una de les diferents poblacions a la quasiespècies amb una combinació determinada de nt o aa, anomenades haplotips, cada una de les quals equivaldrien a una variant genètica. Per aquest tipus d'anàlisi era necessari escollir una plataforma basada en una tecnologia de seqüenciació que permetés obtenir les lectures de seqüència el més llargues possible. Això faria possible agrupar dins un mateix "read" el màxim de canvis d'aa relacionats amb la resistència al tractament antiviral amb NUCs, que poden estar repartits pels diferents dominis funcionals del domini RT [veure subapartats de 2.5.1. Resistència al tractament antiviral amb anàlegs de nucleòsids i nucleòtids (NUCs)]. Si dues substitucions de nt o aa no es troben en el mateix "read" encara es podria realitzar un anàlisi per columnes (anàlisi dels canvis de nt individuals de la quasiespècies sense tenir en compte a quina variant s'associen). Aquest

anàlisi faria possible analitzar la freqüència de cada canvi a la quasiespècies del VHB, però seria difícil determinar la seva presència simultània en la mateixa variant, sobretot si totes dues substitucions són minoritàries a la quasiespècies viral.

En el moment en que el grup de recerca del doctorand va començar a treballar amb tècniques de seqüenciació massiva estaven disponibles les primeres versions de les plataformes de segona generació (veure 2.3.4.4. Tècniques de seqüenciació massiva). En el moment de dissenyar el primer estudi, la plataforma de seqüenciació que generava “reads” més llargs era clarament la GS-FLX (Roche, 454 Life technologies) basada en la tecnologia d’UDPS (473) que llavors permetia analitzar fragments de fins a 250 parells de bases (pb). Durant el transcurs d’aquesta tesi, les tecnologies de seqüenciació massiva han continuat evolucionant i en el moment d’escriure aquesta memòria estan ja disponibles algunes de les noves plataformes de seqüenciació de tercera generació o “lectura llarga” que poden llegir seqüències de varies quilobases (Kb) de longitud, tot i que moltes d’elles encara estan en diferents fases del seu desenvolupament i els cal millorar la seva taxa d’error i rendiment (466)

En el moment de planificar el segon estudi, les tecnologies d’UDPS seguien sent les tecnologies de seqüenciació de segona generació que generaven “reads” més llargs: llavors ja permetia analitzar fragments fins a 400 pb amb la plataforma GS-Junior i fins a 800 pb amb la GS-FLX+. Per altra banda, llavors el grup de recerca del doctorand ja comptava amb bastanta experiència acumulada amb les tecnologies d’UDPS (386,424,592,627) cosa que va portar a seleccionar de nou aquesta tecnologia pel segon estudi. Aquest estudi es va realitzar a la mateixa regió del domini RT que el primer, però ampliada cap a l’extrem 3’ per tal d’incloure en el mateix amplicó el bucle antigènic que forma la regió MHR a l’ORF S. Això va permetre estudiar, entre altres, el principal epítip de les proteïnes de superfície del VHB: el determinant “a” (140). Aquest nou estudi, es va portar a terme en una plataforma diferent a la del primer, la GS-Junior (Roche, 454 Life technologies), que és una versió de sobretaula de GS-FLX més susceptible d’aplicar-se rutinàriament que aquesta gràcies a un protocol experimental més senzill i costos per experiment més reduïts. Per altra banda, GS-Junior genera un nombre de “reads” per experiment unes 10 vegades inferior a GS-FLX (472). Aquest canvi de tecnologia va obligar a adaptar el filtratge dels “reads” obtinguts, en un estudi en el que el doctorand ha col·laborat (386). L’objectiu d’aquest estudi va ser comparar els resultats de l’anàlisi de la quasiespècies del VHB obtinguts per UDPS amb els obtinguts per clonatge en una mostra de sèrum d’un pacient amb HBC a partir de la que es va amplificar per “nested” PCR una regió de l’ORF PC/Core, que té un menor grau de solapament amb els altres ORFs que la resta i per això és una de les regions més variables del genoma del VHB (360,377). Per reduir el biaix introduït per la PCR en crear les biblioteques d’amplicons per clonatge i seqüenciació directa o UDPS (469) a

partir de la primera ronda d'amplificació es van realitzar dos "nested" PCR: el producte de la primera "nested" es va fer servir per clonatge i seqüenciació i el de la segona per UDPS. Per estudiar la repetibilitat dels resultats d'UDPS entre diferents plataformes, es va analitzar el producte de la segona "nested PCR" mitjançant les dues plataformes d'UDPS disponibles, GS-FLX i GS-Junior. A més, en la plataforma GS-FLX també es va estudiar la repetibilitat intraplataforma, tant en un duplicat dut a terme en el mateix centre pel mateix operari com en un altre duplicat dut a terme en un centre diferent per un operari diferent.

En aquest estudi de validació es van comparar entre 4387 i 17.058 "reads" obtinguts per UDPS amb les plataformes GS-FLX i GS-Junior amb 142 seqüències obtingudes per clonatge, un nombre de clons molt elevat per una sola mostra i no fàcilment reproducible, tot i que clarament inferior al nombre de seqüències obtingudes per UDPS. La reproductibilitat dels resultats es va avaluar a través del coeficient de variació (CV) entre les freqüències de canvi de nt en les 20 posicions polimòrfiques observades tant per UDPS com per clonatge. Així es va observar que els valors del CV en la majoria d'aquestes 20 posicions estaven per sota del 10% en els diferents experiments d'UDPS realitzats a partir de la mateixa biblioteca d'amplicons, uns valors similars als observats en alguns paràmetres bioquímics analitzats rutinàriament en laboratoris d'anàlisis clíniques (628,629). En canvi, com era d'esperar, en general el CV entre les diferents tècniques d'UDPS i el clonatge va ser més elevat (al voltant d'un 20%), ja que es partia de biblioteques d'amplicons diferents i de mostres de la quasiespècies de mides molt diferents. En contrast, a l'estudi de clons es van detectar alguns haplotips que no hi eren als diferents duplicats per UDPS, entre ells casos amb insercions i delecions que el filtratge UDPS elimina.

En aquest estudi de validació de la nova tecnologia d'UDPS també es va avaluar el seu nivell de sensibilitat, mitjançant el processament d'una seqüència plasmídica del VHB en els experiments d'UDPS, a partir del que es va determinar la freqüència més alta d'una variant diferent de l'esperada (s'assumeix que totes les seqüències que provenen del mateix clon han de ser iguals) representada en les seqüències dels clons. Aquesta freqüència va ser el 0,25% dels "reads". Així doncs aquest va ser el nivell de sensibilitat fixat per la nova tecnologia, prop de 10 vegades més alt que el nivell del primer estudi. Aquesta disminució de la sensibilitat a causa d'una taxa d'error més elevada de la tècnica era una conseqüència esperable d'augmentar la longitud dels "reads" (de 250 pb en el primer estudi a 400 pb en el segon), ja que tant l'amplificació de les biblioteques d'amplicons per PCR com la seqüenciació per UDPS són processos amb tendència a introduir errors com mutacions puntuals, insercions i delecions (indels) i seqüències recombinants, que en general depenen de la taxa d'error de les diferents PCRs tant d'amplificació de les biblioteques com en emulsió i seqüenciació d'amplicons, i també de la longitud dels "reads" (469,470). En conclusió, a un nivell de sensibilitat del 0,25% de la

quasiespècies, la probabilitat de validar variants artefactuals és molt baixa i la reproductibilitat dels resultats entre les diferents plataformes d'UDPS es molt bona. Per tant en el segon estudi d'aquesta tesi es va adoptar aquest nivell de sensibilitat per l'anàlisi dels "reads" obtinguts.

5.1.2.2. Filtratge i correcció d'errors en "Ultra-deep Pyrosequencing":

Tal com s'ha explicat a l'apartat anterior, la creació de les biblioteques d'amplicons per PCR i el procediment de seqüenciació per UDPS genera una sèrie variants artefactuals inherents a aquestes tècniques, que en general depenen de la taxa d'error d'aquestes PCRs i de la longitud dels "reads" (469,470). La inferència de l'estructura d'una quasiespècies basant-se en aquestes dades, a priori confuses, es porta a terme en diferents etapes que inclouen el filtratge, l'alineament i la correcció d'errors en els "reads".

En tots dos estudis i de fet en qualsevol estudi UDPS. A part dels filtres automàtics que aplica la pròpia plataforma durant el "base calling" per eliminar les dades provinents de pouets amb senyals lumínics de mala qualitat [veure 2.3.4.4.1. La tecnologia d'"Ultra-deep pyrosequencing" (UDPS)], l'exactitud dels resultats obtinguts es pot potenciar tenint en compte els patrons d'errors específics de la tecnologia d'UDPS, com per exemple els indels o canvis de nt a les regions homopolimèriques (473). En el primer estudi es va construir una matriu específica de freqüències esperades de canvis de nt que tenen lloc en regions homopolimèriques i una altra per regions no homopolimèriques per ajustar la probabilitat que un canvi de nt determinat sigui real en aquesta regió calculat per la formula de la distribució de Poisson. En l'algoritme utilitzat en el segon estudi, s'ha tingut en compte que en general els errors en seqüències homopolimèriques i no homopolimèriques tenen lloc independentment en les cadenes directa i reversa, per tant en confrontar els "reads" de les dues cadenes que vinguin d'una mateixa mostra, tots aquells haplotips només presents en una de les cadenes són eliminats. Pel que fa als indels, en el primer estudi es van eliminar tots els "reads" que en contenien aquests tipus de canvis mitjançant un alineament global amb la seqüència màster. No obstant aquest sistema de filtratge amb un filtre de Poisson, tot i permetre un nivell molt baix de sensibilitat (0,03%) era molt restrictiu i requeria cobertures molt altes (molts "reads" per mostra) cosa que limitava la quantitat de mostres per experiment i n'augmentava el cost. En el segon estudi, aquest criteri es va refinar valorant la homogeneïtat de la seqüenciació en totes dues direccions sense aplicar matrius específiques de canvis i amb un llindar establert per clons, per preservar el màxim possible de "reads". Amb el nou disseny es va aconseguir preservar moltes més seqüències cosa que va permetre el processat de més mostres i sense requerir cobertures tan altes com les del primer estudi, tot i que amb una sensibilitat inferior (0,25%). A pesar d'això aquesta cobertura

segueix sent millor que molts estudis publicats en aquest camp (590,591,593,630) i a amb un cost inferior dels experiments. No obstant, una limitació dels dos estudis és que el sistema de filtratge utilitzat en ells no ha pogut detectar variants amb indels, molt difícils de discriminar dels artefactes del sistema. Per altra banda, donada la funcionalitat de les proteïnes codificades per la regió del genoma del VHB estudiada (el centre actiu de la transcriptasa reversa de la polimerasa viral i un determinant crític per la infectivitat viral) i el locus del genoma en la que es troben, on el rcADN o el pgARN no tenen cap peculiaritat estructural, fa difícil pensar que hi puguin haver variants genètiques amb delecions en proporcions significatives.

S'ha de tenir en compte que un cop fet el filtratge inicial que permet eliminar els "reads" de mala qualitat, cal separar aquells que representen variants creades per vertadera variació genètica dins la quasiespècies, de les creades per errors d'amplificació i/o seqüenciació. Aquests variants creades "in vitro" pels sistemes d'amplificació es generen bàsicament pels mateixos mecanismes que les variants genètiques de la quasiespècies "in vivo", per tant separar uns "reads" dels altres és difícil i requereix controls addicionals als experiments. En aquest sentit en el primer estudi es va assumir que la font principal per la que es generaven aquestes variants "in vitro", era la incorporació errònia de nt en els amplicons que formaran les biblioteques que es sotmetran a UDPS, tal com s'havia observat en un estudi previ (602). Per tal d'acotar aquesta font d'error es va dissenyar un control dels errors del sistema que consistia a processar per triplicat un clon que contenia la regió analitzada per UDPS de la qual es coneixia la seqüència, assumint que totes les molècules d'ADN d'aquests clons eren iguals i per tant qualsevol diferència que s'observés en els "reads" era un error del sistema. D'aquesta manera es van estimar les probabilitats que tingués lloc una substitució de nt, diferent segons el canvi de nt (A:C, A:T, A:G, C:A, C:T, C:G, T:A, T:C, T:G, G:A, G:C, G:T) i si aquesta té lloc en una regió homopolimèrica o no del genoma viral i les probabilitats d'error d'aquestes matrius es van aplicar a un filtre de Poisson, que ha permès calcular la probabilitat que un canvi de nt concret en una posició determinada del fragment estudiat i present en un nombre determinat de "reads" és erroni o no. No obstant, mentre aquesta tesi estava en curs alguns estudis van informar que les recombinacions entre amplicons durant la PCR també eren una important font de variants artefactuals originades durant la UDPS (469,470,631). Els haplotips erronis distribuïts aleatòriament en el conjunt de "reads" obtinguts hi són relativament rars (469), per tant el filtratge restrictiu dels "reads" en els dos estudis podria haver eliminat alguns dels haplotips recombinants, però no es pot descartar que la presència d'aquests haplotips pugui haver introduït un cert biaix en els resultats dels dos estudis, i per tant aquesta és una limitació que cal tenir en compte.

Per minimitzar la creació d'aquests haplotips deguts a les substitucions de nt i a les recombinacions "in vitro" cal dur a terme les PCRs en unes condicions que afavoreixin la fidelitat de les còpies generades, per la qual cosa és crítica l'elecció d'una polimerasa adequada. Aquesta polimerasa hauria de tenir una taxa d'error el més baixa possible, per tal de copiar les variants originals de la quasiespècies amb la màxima fidelitat possible. Per aquest motiu, en els dos estudis s'han utilitzat polimerases d'alta fidelitat per crear les biblioteques d'amplicons: en el primer estudi s'ha utilitzat la Pfu Turbo (Agilent Technologies, USA) la qual té una taxa d'error de un de cada 1,3 milions de pb incorporats segons la informació proporcionada pel fabricant (603). En el segon estudi, s'ha utilitzat una altra versió d'aquest enzim, la Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), amb un rang d'error encara més baix, un de cada 2,5 milions de pb segons la informació proporcionada pel fabricant (621). Un altre paràmetre a tenir en compte és la velocitat a la que en les polimerases incorporen nt, que determina l'eficiència amb que poden catalitzar la síntesi d'aquests amplicons (632). Donat que un dels motius pels que es pot produir la recombinació durant la PCR és la presència d'amplicons incomplets i curts que actuen com encebadors en cadenes diferents (631,633), una major eficiència (velocitat) d'incorporació de nt pot ajudar a minimitzar la presència d'aquests amplicons incomplets. Amb la utilització de la nova Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase es va millorar molt en aquest sentit, ja que va permetre passar dels temps d'extensió de un minut per Kb de la Pfu turbo a 15 segons per Kb de la Pfu Ultra II (603,621). Per altra banda, com que en general els esdeveniments de recombinació solen tenir lloc durant els darrers cicles de la PCR, reduir els cicles d'amplificació als mínims imprescindibles per amplificar el motlle també podria ajudar a reduir els fenòmens de recombinació (633).

5.2. ANÀLISI DEL DOMINI DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (ORF P) I EL BUCLE ANTIGÈNIC DE LA REGIÓ HIDROFÍLICA PRINCIPAL (ORF S):

5.2.1. Anàlisi del domini RT de la polimerasa en mostres de pretractament:

En el primer estudi es va analitzar una mostra de quatre pacients amb HBC abans de rebre qualsevol tractament amb NUCs. En el domini RT de la polimerasa viral, la proporció de canvis d'aa va ser relativament baixa, només 13 d'aquests tenien freqüències mitjanes >0,1% i d'aquests només quatre estaven relacionats amb la resistència a NUCs. Aquests resultats eren esperables si es té en compte que en absència de tractament antiviral, la variant amb una capacitat replicativa ("fitness") més elevat és la "wild-type" (117,365) i les freqüències de la resta de variants amb un "fitness" més reduït probablement es deguin a la dinàmica natural de

les variants de la quasiespècies del VHB. Tanmateix, les proporcions d'aquests canvis detectats en pretractament no semblava estar relacionada amb els canvis que es van detectar després del tractament amb LAM per hibridació reversa (LiPA) o seqüenciació directa. Crida l'atenció que aquestes tècniques detectessin preferentment el canvi rtM204V en el VBK després del tractament amb LAM, quan en pretractament el canvi rtM204I sempre estava representat en proporcions més altes. Tots dos canvis han estat relacionats amb la resistència a aquest fàrmac (606) i no sembla haver-hi dades que demostrin que un canvi té una sensibilitat més reduïda que l'altre a LAM. Tanmateix, sí que s'ha descrit que mentre que la mutació rtM204I sol detectar-se aïllada, les variants amb rtM204V solen tenir a més altres canvis compensatoris en els dominis funcionals A i B del RT, especialment la mutació rtL180M (536). Això sembla suggerir que aïlladament el fitness replicatiu de rtM204I és superior a rtM204V (en pretractament no es van observar combinacions de canvis d'aa a la polimerasa viral en cap dels pacients), en contrast amb els resultats d'estudis previs que indiquen que en absència de tractament totes dues tenen la mateixa capacitat replicativa (525). En tot cas, les mutacions compensatòries que solen acompanyar rtM204V li donarien un fitness replicatiu més elevat que rtM204I en presència de LAM i per això aquesta acabaria sent la dominant a la quasiespècies en un anàlisi per columnes. En el mateix sentit, les variants amb el canvi rtA181T que eren les variants resistents majoritàries (0,09%) en la mostra basal del pacient que va ser analitzat de manera seqüencial van ser les responsables de la fallada dels tractaments amb LAM i després amb ADV, mentre que un altre pacient amb una proporció basal superior (0,18%) no la va seleccionar amb el tractament amb LAM, i en canvi va seleccionar la variant rtM204V que tenia una proporció més baixa (0,09%). Aquests exemples il·lustren que, probablement, la selecció de variants amb substitucions d'aa relacionades amb la resistència al tractament antiviral amb NUCs durant el transcurs d'aquest no depengui només de la proporció de variants amb aquestes substitucions, o en tot cas podria dependre també d'altres factors virològics. Per tant la proporció de variants amb mutacions de resistència al tractament antiviral en pretractament dona poca informació sobre l'evolució de la quasiespècies durant el tractament amb NUCs.

Altres estudis molt recents han analitzat per UDPS la quasiespècies del VHB en la regió on es solapen el domini RT de la polimerasa viral amb l'ORF S en mostres de pretractament amb NUCs i semblen coincidir amb aquesta conclusió. En un d'aquests estudis (630) en el que es van incloure mostres basals de 16 pacients amb HBC "naïve" per NUCs que no van respondre al tractament, cap de les mutacions detectades per LiPA després del tractament antiviral es va poder detectar abans del tractament per UDPS a un nivell de sensibilitat de l'1% de la quasiespècies. En un altre estudi (634) en el que s'han inclòs mostres basals de 36 pacients amb HBC "naïve" per NUCs tractats amb ADV, s'ha observat que la distribució i la freqüència de les substitucions a les posicions d'aa clàssiques associades a la resistència primària a aquest

fàrmac (rt181 i rt236) presents en la majoria de mostres analitzades en proporcions entre el 0,02 i el 2% de la quasiespècies eren mals predictors de la resposta a aquest tractament, també en la línia dels resultats obtinguts en aquesta tesi. No obstant, en aquest estudi es van identificar 11 substitucions de nt la freqüència de combinació de les quals es va associar significativament amb la resposta antiviral. En un altre estudi recent (635), en el que es van incloure 36 pacients tractats amb LAM (comparant 18 amb resposta i 18 que no van respondre) s'indica la possibilitat que la diversitat de la regió del domini RT, mesurada a nivell de nt i aa a través de l'entropia de Shannon (Sn) i distància genètica mitjana i a nivell de nt per substitucions sinònimes i no sinònimes per posició podria ser un predictor de l'eficàcia del tractament antiviral. Per tant sembla que la selecció de variants resistents a un tractament antiviral pot estar associada a altres paràmetres diferents de la seva proporció abans del tractament.

5.2.2. El determinant “a” i anàlisi de posicions conservades:

En les mostres obtingudes en pretractament en el primer estudi l'ORF S va mostrar en general una variabilitat més gran que el P, amb 21 substitucions d'aa en proporcions >0,1% enfront de les 13 del domini RT. Tanmateix pràcticament tots aquests canvis d'aa es trobaven fora del determinant “a” (posicions s124-s147), on només la substitució sG145R [principal mutació relacionada amb l'escapament a la vacunació antiviral (175)] es trobava per sobre del 0,1% en dos pacients. Aquests resultats semblen concordar amb un estudi posterior (436), en el que es va analitzar per seqüenciació directa la regió de l'ORF S que codifica la SHBs en 360 pacients amb HBC de genotip D. Tot i la sensibilitat reduïda d'aquesta tècnica es va observar al menys un canvi d'aa en la majoria d'aquests pacients (61,6%), però la majoria d'ells estaven agrupats fora del determinant “a”, especialment en epítops de limfòcits T citotòxics. El determinant “a” és un epítop conformacional (140) contra el que es dirigeixen els anticossos anti-HBs (141), per tant seria esperable trobar una certa variabilitat en aquesta regió per tal d'escapar del sistema immunitari de l'hoste. Tanmateix aquesta regió realitza dos funcions molt importants per la biologia del VHB: intervé en la secreció de les partícules virals (26,146) i és imprescindible per la seva infectivitat (147,262) (veure 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície). Això fa necessari conservar la integritat estructural d'aquesta regió. Per altra banda, el VHB pot haver desenvolupat estratègies alternatives a modificar l'estructura d'aquest epítop per evadir la resposta immunitària contra ell, com per exemple la sobreproducció de HBsAg que dona lloc a les SVP (partícules buides formades fonamentalment per proteïnes de superfície MHBs i SHBs), que es poden trobar en el sèrum de pacients infectats en títols fins a 10.000 vegades més alts que les partícules virals (22), i a més es creu que poden tenir un important paper immunosupressor de la resposta immunitària específica contra el VHB (179,180).

La importància del determinant “a” per la biologia del VHB permet explicar observacions fetes en els dos estudis: en el primer estudi, es van comparar les variabilitats relatives dels ORF P i S, solapats a la mateixa seqüència de nt analitzada. Aquesta comparació va mostrar, tal com s’havia observat en un estudi previ (138), que els dos ORFs semblen evolucionar independentment per conservar les posicions essencials que permeten realitzar les seves funcions als productes que codifiquen. Per tant a la regió N-terminal d’aquests ORF, que correspon als aa rtY148-rtY158 en el P i sT140-sI150 en el S, l’ORF S va ser el més conservat, en canvi en la regió C-terminal (aa rtR192-rtV208 en l’ORF P i sV184-sY200 en el S) que conté el motiu del centre catalític del domini RT YMDD, l’ORF P estava més conservat. Tanmateix, a pesar de la rellevància i l’alt grau de conservació del determinant “a”, el residu rtL155 de l’ORF P, situat entre els dominis funcionals A i B de la polimerasa viral i sense cap funció concreta assignada, va demostrar una proporció de canvis de nt no sinònims extraordinàriament baixa (dn=0,02%), molt més que la de les posicions solapades de l’ORF S, sN146 [posició de N-glicosilació, essencial per la secreció de partícules virals (26,146) dn=0,10%] i sC147 [que forma part de la xarxa de cisteïnes que estableixen la conformació del determinant “a” i el bucle antigènic (148), dn=0,09%]. En un model de la polimerasa del VHB (604) aquest aa hidròfob s’ha situat a la superfície del domini RT de la polimerasa, la qual cosa no vol dir la superfície de la proteïna, que és multifuncional, on possiblement pugui participar en interaccions proteïna-proteïna, com per exemple amb xaperones o inclús el domini proteïna terminal (TP) de l’extrem N-terminal de la polimerasa, que interacciona amb el RT per activar la polimerasa i permetre la seva interacció amb la seqüència ϵ del pgARN (99,327,328). La funció real d’aquesta posició tan conservada s’hauria de determinar mitjançant estudis fenotípics. En el segon estudi dels quatre pacients als que se’ls va estudiar la quasiespècies de la regió solapada entre el domini RT i el determinant “a”, cap d’ells va seleccionar variants amb mutacions al determinant “a” entre els 12 i els 27 mesos després del trasplantament, per tant la variant “wild-type” d’aquest epítop va ser la responsable de la re-infecció del fetge trasplantat a pesar de la profilaxi amb HBIg, que són fonamentalment anticossos anti-HBs (559). A pesar de l’efecte coll d’ampolla sobre la quasiespècies d’aquests pacients i de la immunoprofilaxi amb HBIg indica de nou la importància pel VHB de la conservació d’aquesta regió, i suggereix que la HBIg o no exerceix cap pressió selectiva sobre aquesta regió, o potser hi ha algun altre mecanisme que permeti al virus escapar-se d’aquesta pressió sense alterar l’estructura del determinant “a”.

5.2.3. Codons stop a l'ORF S:

En el primer estudi també és especialment rellevant que en l'ORF S vuit de les 21 substitucions d'aa en proporcions >0,1% en les mostres de pretractament donessin lloc a codons stop (*) prematurs, la meitat de les quals estaven solapades amb posicions del domini RT relacionades amb la resistència a NUCs [rtA181T/sW172*, rtV191I/sW182*, rtM204I/sW196* i rtV207I/sW199* (438,439,606)]. La resta de codons stop estaven localitzats en epítops de limfòcits T, especialment en l'epítop de limfòcits T col·laboradors entre les posicions sW156 i sL175 (599) (sW156*, sW163*, sW165* i sW172*) i el codó stop restant es troba en una regió epitòpica de limfòcits T citotòxics (sW191*). De nou, aquests resultats concorden amb l'estudi en el que es va analitzar per seqüenciació directa la regió que codifica la SHBs en 360 pacients amb HBC de genotip D (436), en el que es va identificar 20 codons stop en diferents epítops.

És especialment significatiu que tots aquests codons stop es produeixin en posicions que codifiquen triptòfans (W). Només cal un canvi de nt per passar de W a stop (TGG → TGA o TGG → TAG). A més, aquest canvi pot estar afavorit per un mecanisme innat de defensa antiviral mediat per l'enzim “apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G” (APOBEC3G), una citidina desaminasa que indueix la hipermutació de guanina a adenina en VHB (371). El fet que aquests codons stop tinguin lloc preferentment en regions epitòpiques suggereix que aquests canvis poden estar relacionats amb l'escapament immunitari, tanmateix s'ha descrit que MHBs amb truncaments a l'extrem C-terminal tenen no tenen una funció estructural sinó trans-activadora (53,636,637) [veure 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície]. Així doncs, la freqüència relativament alta de codons stop en el ORF S, produïts a partir d'un canvi d'aa molt concret, suggereixen que el VHB podria aprofitar el mecanisme de defensa innata de l'hoste mediat per APOBEC3G, juntament amb la seva pròpia variabilitat intrínseca, per generar nous productes gènics amb funcions diferents als originals mitjançant un mecanisme de multicodificació.

Durant el seguiment longitudinal del pacient tractat seqüencialment amb varis NUCs, realitzat en el primer estudi, a l'ORF S es va observar una elevada freqüència de codons stop, més encara que en pretractament, de manera que sis dels 20 canvis d'aa amb una freqüència mitjana més alta a les cinc mostres longitudinals donaven lloc a codons stop prematurs, la majoria d'ells co-seleccionats amb mutacions relacionades amb la resistència a NUCs a l'ORF P [sW156*, rtA181T/sW172*, rtV191I/sW182*, sW191*, rtM204I/sW196* i rtV207I/sW199* (438,439,606)]. La freqüència d'aquests stops és especialment elevada en les mostres obtingudes després del tractament amb LAM i d'ADV a causa de sW172* (71.7% i 64% respectivament) co-seleccionat amb el canvi rtA181T en l'ORF P (canvis de nt TGG → TGA en

l'ORF S i GCT → ACT a l'ORF P) relacionat amb la resistència a aquests dos tractaments (430). S'ha descrit "in vitro" que les variants amb aquest canvi són defectives per la secreció de partícules virals (438), per tant una quasiespècies amb una presència tan majoritària de variants genètiques defectives no podria ser viable si no comptes amb un mecanisme de trans-complementació. En el cas de les proteïnes de superfície cal recordar que es produeixen en un gran excés respecte les partícules virals i formen SVP en proporcions que poden arribar a ser de 10.000 a 1 respecte les partícules virals (22). Tal com s'ha suggerit en l'apartat anterior, aquest excés de SVP pot tenir una funció immunomoduladora ("enganyar" la resposta anti-HBs o inclús evitar l'estimulació de limfòcits T). No obstant una vegada observada la significativa i sistemàtica presència de genomes del VHB amb codons stop prematurs a la regió S i per tan potencialment defectius per embolcallar les partícules virals, es podria suggerir que aquest excés de producció de proteïnes de superfície podria tenir com una de les seves funcions compensar la falta de producció de proteïnes de superfície funcionals per part de les variants amb codons stop, com ja havia estat suggerit prèviament (538). Diferents estudis han descrit la presència de codons stop a l'ORF S en pacients que han desenvolupat HCC després del tractament prolongat amb LAM, particularment degut a rtA181T/sW172* (440,442). Així tots els pacients que han seleccionat variants resistents a aquest tractament antiviral podrien beneficiar-se de la monitorització d'aquestes variants amb un mètode amb la màxima sensibilitat com a marcador precoç del risc de desenvolupar HCC.

La selecció massiva de variants amb rtA181T/sW172* també va ser observada després del trasplantament hepàtic (al segon estudi) en el pacient 2, que estava en tractament profilàctic amb HBIG+LAM. És possible que la freqüència elevada d'aquesta substitució (90,9% de la quasiespècies viral) contribuís a la no detecció de HBsAg en aquest pacient durant la recurrència de la infecció post-trasplantament, ja que pot produir canvis estructurals profunds en les SVP "in vitro" (438), en les quals es basa la detecció del HBsAg per kits comercials (142). Tanmateix, el fet que la recurrència post-trasplantament fos possible amb aquesta variant suggereix que "in vivo" l'efecte que podria tenir sobre les SVP seria diferent, i en tot cas, que la petita proporció de la quasiespècies capaç de sintetitzar proteïnes de superfície íntegres seria suficient per embolcallar els genomes defectius de manera que poguessin ser secretats.

5.2.4. Anàlisi longitudinal del domini RT de la polimerasa durant el tractament seqüencial amb NUCs:

En el primer estudi s'han analitzat les dinàmiques de les variants a la quasiespècies viral al llarg del tractament seqüencial amb LAM, ADV i ETV en un pacient que va experimentar la fallada d'aquests tres tractaments. Aquest estudi s'ha dut a terme ordenant cada substitució d'aa d'acord

amb la desviació estàndard (SD) de les seves freqüències en els “reads” validats de les cinc mostres seqüencials, de manera que els canvis d’aa amb una variació més gran de la seva freqüència al llarg de l’anàlisi longitudinal seran col·locats en les primeres posicions perquè tindran un SD més elevat. En estudis del domini RT per UDPS anteriors a l’inclòs en aquesta tesi (590,591) no s’havia caracteritzat la variabilitat d’una mateixa quasiespècies al llarg d’un període de tractament amb diferents NUCs, i es centraven bàsicament a descriure la variabilitat de la quasiespècies per UDPS i comparar els resultats obtinguts pels mètodes convencionals d’estudi de la quasiespècies del VHB utilitzats fins aleshores: hibridació reversa amb LiPA i seqüenciació directa (591) o seqüenciació directa amb pas previ de clonatge molecular (590). Pocs estudis posteriors han realitzat aquesta mena d’estudis seqüencials, entre ells destaca el de Rodríguez i col·laboradors (638), que van optar per la representació gràfica dels resultats per avaluar la dinàmica de diferents substitucions d’aa en els ORF P i S al llarg del tractament antiviral. El mètode utilitzat en el primer estudi d’aquesta tesi té l’avantatge que permet “escanejar” el genoma del VHB per buscar els canvis rellevants per explicar situacions clíniques o fenòmens virològics com les resistències creuades o múltiples al tractament antiviral “a cegues”, és a dir, sense partir de cap assumptió prèvia de les posicions del genoma i tipus de canvis que porten a desenvolupar resistències al tractament antiviral amb NUCs.

Els resultats obtinguts mitjançant aquest mètode d’anàlisi són coherents amb la situació clínica de resistència a múltiples tractaments del pacient analitzat: es van col·locar en les primeres posicions canvis d’aa associats a la resistència als diferents tractaments amb NUCs que va rebre el pacient: rtL180M, rtM204V, rtS202G, rtV207I, rtA181T, rtV173L, rtI169T, rtV191I, rtM204I, rtT184A, rtA181S i rtA200V (430,439,607,608). La majoria d’aquestes posicions tenen una associació ben caracteritzada amb la resistència primària, secundària o baixa sensibilitat al tractament antiviral, tanmateix aquest mètode va posar en relleu el paper de canvis d’aa associats a la resistència a NUCs amb menys freqüència com rtV191I, rtA181S i rtA200V. Inicialment no érem conscients de l’associació d’aquestes tres variants minoritàries amb les resistències als tractaments antivirals, no obstant, la posterior recerca bibliogràfica va confirmar el paper en la resistència al tractament amb NUCs de la família dels L-nucleòsids (particularment LAM) de rtV191I i rtA200V (439,525,608) i l’associació de la selecció de rtA181S amb el tractament amb ADV (608). Així doncs, aquests resultats van confirmar la utilitat de la metodologia establerta en aquest estudi com una eina per “escanejar” genomes virals a la recerca dels canvis rellevants per explicar situacions clíniques o fenòmens virològics i proporcionar resultats comparables als d’assaigs fenotípics gràcies a la capacitat d’aquesta metodologia per detectar els canvis en les freqüències de les diferents substitucions d’aa.

Durant el seguiment longitudinal de la quasiespècies al llarg del tractament amb diferents NUCs no només s'ha fet un anàlisi per columnes dels canvis d'aa més variables al llarg d'aquest seguiment, sinó també un anàlisi per files per tal d'estudiar el seu lligament ("linkage") en una mateixa variant. Aquest anàlisi permet completar la visió parcial de la quasiespècies que mostra l'anàlisi de les freqüències dels canvis individuals, perquè permet caracteritzar les combinacions d'aquests canvis en les variants genètiques que formen la quasiespècies del VHB. Per tal de facilitar l'anàlisi bioinformàtic de les combinacions dels múltiples canvis d'aa detectats al domini RT al llarg del seguiment longitudinal, en aquest estudi l'anàlisi de lligament s'ha fet a partir de les 10 mutacions amb un SD més elevat durant aquest seguiment. Així doncs s'ha inclòs a l'anàlisi les mutacions rtL180M, rtM204V, rtS202G, rtV207I, rtA181T, rtV173L, rtI169T, rtV191I, rtM204I i rtT184A, que s'ha assumit que són les més rellevants per estudiar l'adaptació de la quasiespècies del VHB al tractament antiviral amb NUCs. Aquest anàlisi ha demostrat que els canvis relacionats amb la resistència a NUCs agrupats en variants combinades (a excepció de rtA181T) van ser la principal causa de la resistència al tractament amb NUCs del pacient tractat seqüencialment. En l'estudi seqüencial de la quasiespècies del VHB de Rodríguez i col·laboradors (638) també es va analitzar el lligament de mutacions en una mateixa variant genètica en els set pacients estudiats. Tots aquests pacients van rebre ADV com a primer tractament de la família dels NUCs i durant el transcurs d'aquest van presentar evidències de selecció de variants resistents a aquest tractament per seqüenciació directa. En aquest estudi l'anàlisi del lligament es va portar a terme a partir d'un "software" específic que selecciona les substitucions rellevants en funció del seu creixement o decreixement exponencial al llarg del seguiment dels pacients, un sistema similar al basat en la SD de les freqüències de les mutacions al llarg del seguiment del pacient tractat seqüencialment en el primer estudi. Els resultats d'aquest anàlisi de lligament mostren una selecció de rtA181T/V preferentment sola o combinada amb rtN236T, totes dues mutacions relacionades amb la resistència a ADV (veure 2.5.1.3. Resistències a Fosfonats acíclics). En el primer dels estudis inclosos en aquesta tesi no es va incloure l'estudi de la posició N236T tot i la importància d'aquest canvi amb el tractament amb ADV (el segon que va rebre el pacient tractat seqüencialment). Això va ser degut a que aquest canvi no es va detectar en la fallada d'aquest tractament per seqüenciació directa ni hibridació reversa (LiPA), la qual cosa feia improbable que la combinació rtA181T-rtN236T estigués present en proporcions significatives. Degut a les limitacions de longitud de la regió a analitzar per UDPS (limitada a 250 pb) no es va tenir en compte aquesta posició en seleccionar el fragment a seqüenciar.

Cal tenir en compte que l'anàlisi de lligament d'aquestes 10 mutacions pot estar esbiaixat per fenòmens de recombinació durant l'amplificació de les biblioteques d'amplicons, la qual cosa podria haver generat "in vitro" les variants amb combinacions de mutacions observades després

de cada tractament antiviral. Malgrat això, després dels tractaments amb LAM i ADV, es va observar una selecció massiva de variants on la substitució rtA181T era la única mutació present de les 10 estudiades. A més, en les variants en que rtA181T estava combinada amb alguna altre de les estudiades, aquesta combinació no era a l'atzar sinó que únicament es donava en proporcions significatives amb rtV191I. Per altra banda, la presència de la variant combinada rtL180M-rtS202G-rtM204V-rtV207I a la mostra analitzada després del rebot virològic amb ETV va ser confirmada per clonatge i seqüenciació d'una biblioteca d'amplicons diferent a la processada per UDPS. En aquesta biblioteca seguia sent la variant dominant a la quasiespècies, i també es va detectar la presència de la variant amb la combinació de canvis rtI169T-rtV173L-rtL180M-rtM204V, que havia estat detectada en un 10% de la quasiespècies per UDPS. Finalment, el paper compensatori de rtM204V per la mutació rtV207I (no associada a la resistència a ETV abans d'aquest estudi) també sembla possible a partir dels resultats de l'anàlisi retrospectiu d'informació acumulada amb la primera versió de l'assaig INNO-LiPA DR (basat en hibridació reversa), en el que el 39% dels 50 pacients analitzats tenien les dues mutacions. Tot això dona credibilitat a les variants dominants a la quasiespècies del VHB detectades en les diferents mostres, ja que si els haplotips generats per UDPS s'haguessin format majoritàriament "in vitro" seria esperable una distribució aleatòria d'un conjunt de variants en proporcions relatives inferiors a les obtingudes (469). En tot cas, no es pot descartar que la recombinació o altres alteracions de l'estructura de la quasiespècies produïdes "in vitro" puguin haver donat lloc a alguna de les variants minoritàries o introduït un cert biaix en les proporcions de les majoritàries. Per altra banda els resultats obtinguts també semblen indicar per primera vegada un possible paper compensatori de rtA181T per part de rtV191I, evidenciant de nou el possible valor fenotípic dels resultats obtinguts. Tanmateix aquesta compensació hauria de ser confirmada per assaigs fenotípics ben establerts. De fet a l'anàlisi de lligament de l'estudi de Rodríguez i col·laboradors (638) no s'observa la selecció de rtV191I-rtA181T. Tot i així, els pacients inclosos en aquest anàlisi només van rebre ADV i s'ha demostrat fenotípicament la sensibilitat de rtV191I sola a ADV (639) així com la seva resistència a LAM (439). Això sembla coincidir amb els resultats obtinguts en el pacient tractat seqüencialment en el primer estudi que va seleccionar aquest canvi durant el tractament amb LAM però la seva proporció sense estar combinat amb rtA181T va disminuir durant ADV (veure 3.3.3. Anàlisi longitudinal de les mostres del tractament seqüencial amb NUCs). Per tant els resultats obtinguts en el grup de pacients analitzat en l'estudi Rodríguez i col·laboradors no semblen directament comparables als obtinguts en el primer estudi d'aquesta tesi.

5.2.5. Anàlisi de la diversitat de la quasiespècies del VHB:

Tant en el primer com en el segon estudi s'ha analitzat la dinàmica de la variabilitat global de la quasiespècies en la regió del genoma del VHB analitzada. En el primer estudi això s'ha fet al llarg de l'estudi longitudinal del pacient tractat seqüencialment amb LAM, ADV i ETV on a cada mostra es van analitzar les divergències a nivell de nt i d'aa (ORF P i S). Aquest paràmetre es va calcular com el percentatge de seqüències diferents en cada mostra en relació a la seqüència màster de la mostra basal i a la seqüència màster i de cada mostra. La comparació respecte la seqüència màster de la mostra basal permet analitzar els canvis que ha patit la quasiespècies del VHB a partir d'una situació basal en absència de la pressió selectiva dels NUCs. En canvi, la comparació respecte la seqüència màster de cada mostra evidència la diversificació o simplificació de la quasiespècies en resposta a les pressions selectives a les que estigués sotmesa en un moment donat.

En primer lloc, la divergència respecte la seqüència màster de la mostra basal tant a nivell de nt com dels dos ORFs experimenta un gran augment després del tractament amb NUCs respecte als valors del pretractament, i tot i que en menor mesura, passa el mateix en calcular la divergència respecte la màster de cada seqüència. Això evidència la diversificació de la quasiespècies del VHB per adaptar-se a la pressió exercida pel tractament amb NUCs, tot i que no és la única pressió selectiva sobre la quasiespècies del VHB ja que el sistema immunitari de l'hoste hi exerceix una pressió continua. Això queda reflectit a nivell de l'ORF S, que quan es compara cada seqüència amb la màster de la mateixa mostra sempre és més variable (divergència més alta) que el P tant en les mostres del tractament longitudinal amb NUCs com en pretractament. En molts casos, a l'ORF S es co-seleccionen canvis d'aa juntament amb els seleccionats al domini RT de l'ORF P per efecte del tractament amb NUCs a més dels que també es seleccionen per la pressió del sistema immunitari, ja que la regió analitzada de l'ORF S és molt immunògena: conté part de la seva regió epitòpica principal (determinant "a") i alguns epítops de limfòcits T col·laboradors (Th) i citotòxics com per exemple sW156-sL175 (599), en el qual es va observar que el canvi sS167L incrementava la seva freqüència de manera continua al llarg del seguiment del pacient tractat seqüencialment. Tenint en compte que aquesta substitució està associada a un canvi silent a l'ORF P i localitzada en un epítop de limfòcits Th sembla clar que la seva selecció afavorida pel sistema immunitari i no pels tractaments antivirals. Quan es comparen les divergències dels ORF P i S respecte la seqüència màster de la mostra basal del tractament amb NUCs les dues divergències tendeixen a igualar-se, la qual cosa suggereix que al llarg del tractament amb NUCs, aquests són la principal pressió selectiva que afecta a la quasiespècies viral, a pesar de la pressió del sistema immunitari, per tant la

principal font de variabilitat de l'ORF S durant aquest període són els canvis co-seleccionats amb l'ORF P.

En el cas dels quatre pacients analitzats en el segon estudi, la situació és molt diferent a la del pacient amb HBC analitzat longitudinalment en el primer, ja que en aquests casos la quasiespècies viral ha estat sotmesa a una forta reducció en la grandària de la població viral en extreure el fetge infectat. L'anàlisi per UDPS de les 10 mostres de sèrum d'aquests pacients va mostrar canvis importants en la composició i variabilitat de la quasiespècies del VHB abans de l'OLT i després de la recurrència de la replicació viral, en alguns pacients fins i tot arribava a canviar el genotip del VHB dominant. Una possible explicació per la detecció d'aquestes dos quasiespècies tan diferenciades en el mateix pacient abans i després del trasplantament és la infecció de "novo" del fetge trasplantat. Però es va descartar aquesta hipòtesi perquè s'ha considerat molt improbable, tenint en compte que cap dels pacients va rebre un fetge que fos positiu per anti-HBc i que el tractament profilàctic que estaven rebent feia molt difícil que s'establís una nova infecció per VHB. Així doncs, a pesar de les diferències entre la quasiespècies abans i després de l'OLT es va creure més probable que les variants dominants a la quasiespècies després de l'OLT ja existissin a la d'abans en proporcions per sota el nivell de sensibilitat de la tècnica d'UDPS. Aquesta hipòtesi està avalada perquè s'ha descrit que el VHB pot persistir a l'hoste després d'extreure el fetge infectat gràcies als seus reservoris extrahepàtics, entre els que destaca el sistema limfoide (554,555). En un estudi previ (554) es va detectar ADN-VHB en sèrum i en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica en pacients amb trasplantament hepàtic, anti-HBc positius i HBsAg negatius varis anys després d'extreure el fetge infectat, una situació similar a la dels tres pacients amb recurrència de la infecció amb HBsAg indetectable varis mesos o anys després de l'OLT inclosos en aquest estudi. Així doncs, la infectivitat del VHB no està restringida als hepatòcits, tot i que en aquestes cèl·lules és l'únic lloc on pot transcriure's i replicar-se eficientment degut a la seva dependència de factors de transcripció enriquits o específics en cèl·lules hepàtiques (212).

L'estudi de la diversitat de la quasiespècies del VHB abans i després del trasplantament hepàtic en els quatre pacients estudiats va proporcionar informació per interpretar aquests canvis a la quasiespècies del VHB. En aquest estudi no es van utilitzar els mateixos paràmetres de divergència respecte a una seqüència màster utilitzats en el primer, que en aquest cas tampoc haguessin aportat informació nova. Paral·lelament al desenvolupament d'aquesta tesi, en el grup del doctorand s'han provat diferents índexs de diversitat per analitzar l'evolució de la variabilitat d'una quasiespècies viral o comparar-la entre diferents grups de pacients en estudis en els que el doctorand ha col·laborat (386,624). Tal com s'havia fet en aquests estudis previs, en aquest estudi s'ha avaluat la diversitat de la quasiespècies viral segons l'entropia de Shannon

normalitzada (S_n), la freqüència de mutació (M_f) i la diversitat nucleotídica (P_i). (veure 2.3.1.1. Índexs per estudiar la diversitat de les quasiespècies). Aquests paràmetres s'han calculat únicament sobre les seqüències de nt, ja que a diferència de l'estudi anterior l'objectiu no era avaluar l'efecte d'una pressió selectiva sobre un determinat ORF sinó analitzar els canvis que van tenir lloc en la diversitat de la quasiespècies entre abans i després de l'OLT, per la qual cosa l'estudi a nivell de nt era suficient. El càlcul de S_n mostra una tendència a disminuir la diversitat de la quasiespècies entre abans i després del trasplantament, és a dir, disminueix la diversitat d'haplotips o variants diferents que trobem a la quasiespècies del VHB després de l'OLT, fins a assolir valors similars en els quatre pacients. Aquesta mesura, però, no té en compte les diferències (nombre de canvis) entre aquestes haplotips, és a dir, l'heterogeneïtat dels components de la quasiespècies. Aquest paràmetre es mesura a través dels altres dos índexs, M_f i P_i . Els dos índexs d'heterogeneïtat van tenir el mateix comportament que S_n , la qual cosa indica que després de l'OLT, no només hi havia menys diversitat de variants diferents a la quasiespècies sinó que aquestes variants eren més homogènies entre si que abans de l'OLT. Aquests resultats podrien ser explicats per un efecte coll d'ampolla sobre la diversitat de la quasiespècies del VHB: després d'eliminar-se gran part de la població viral, la quasiespècies es regenera a partir de les poques variants genètiques que queden a l'organisme de l'hoste, probablement en els reservoris extrahepàtics.

Possiblement, les variants que van re-infectar els fetges trasplantats en aquests quatre pacients no haurien pogut diversificar-se en les mostres obtingudes entre 12 i 27 mesos després de l'OLT (que són les que s'han seleccionat per comparar amb les d'abans del trasplantament). Hipotèticament, això es deuria al poc temps transcorregut des de la re-infecció del nou fetge, o bé a la selecció de les variants amb una eficàcia més alta per re-infectar i replicar-se en el nou fetge i en presència de la profilaxis post-OLT, o fins i tot a causa de la suma dels dos factors al mateix temps. En aquest sentit, poden aportar informació els resultats del càlcul de S_n , M_f i P_i d'una segona mostra obtinguda 36 mesos post-OLT en el pacient amb recurrència de la replicació del VHB amb HBsAg positiu, i una obtinguda 58 mesos post-OLT en el pacient 3, amb recurrència HBsAg negatiu. Aquestes mostres no van ser incloses en l'anàlisi anterior, ja que es van obtenir en un interval de temps més llarg des de l'OLT, però s'observa que mentre que en la mostra obtinguda 36 mesos després de l'OLT els resultats dels tres índexs s'estabilitzen, en l'obtinguda en l'altre pacient 58 mesos després de l'OLT S_n , M_f i P_i tornen a augmentar. Això indica que la quasiespècies es torna a diversificar al llarg del temps. Aquesta hipòtesi és recolzada pels resultats d'un estudi recent de la quasiespècies en el domini RT de la polimerasa viral mitjançant UDPS en que ha participat el doctorand (640). En aquest estudi, en un grup de vuit pacients amb HBC tractats amb tenofovir (TDF) que portaven set anys amb supressió sostinguda de la replicació viral [resposta virològica sostinguda (RVS)], s'ha observat

canvis significatius en la composició de la quasiespècies respecte el pretractament després de retirar TDF. La meitat d'aquests pacients fins i tot va experimentar canvis en el genotip dominant. Així doncs, la quasiespècies del VHB pot seguir evolucionant tot i presentar nivells baixos o indetectables de replicació. Mecanismes endògens del propi hoste com la hipermutació de guanina a adenina mitjançant l'enzim APOBEC3G (371), podrien contribuir a aquesta evolució.

Els importants canvis a la composició i variabilitat de la quasiespècies del VHB entre abans i després de l'OLT també s'evidencien pels canvis del genotip del VHB, des de D (abans del trasplantament) a A (després) en dos dels pacients amb recurrència de la replicació del VHB amb HBsAg negatiu. La selecció del genotip A pot haver estat ajudada per l'efecte coll d'ampolla sobre la diversitat de la quasiespècies del VHB. Després de l'OLT hi hauria hagut una reducció dràstica del nombre de genomes de genotip D que dominaven la quasiespècies abans del trasplantament, i entre les variants que persistien en l'hoste després del trasplantament van re-infectar el fetge i replicar-se les de genotip A, possiblement perquè aquestes variants tenen una sensibilitat reduïda al tractament amb NUCs enfront del genotip D. Tal com s'ha comentat a l'apartat 5.1.1.1. Tècniques basades en hibridació: la hibridació reversa, aquests resultats concorden amb els obtinguts en un estudi anterior del grup de doctorand dut a terme per hibridació reversa amb el kit INNO-LiPA HBV Genotyping Assay (445), en el que es va observar que en els pacients tractats amb NUCs hi havia una tendència a seleccionar variants genètiques de genotip A enfront de les de genotip D al llarg del seu seguiment.

L'anàlisi del genotip dels "reads" s'ha portat a terme per filogènesi, el mètode de referència per genotipar el VHB (389), en la que s'ha inclòs la seqüència màster de cada mostra, juntament amb els haplotips amb un 2% de canvis a la seva seqüència respecte la màster i 143 patrons del genoma complet del VHB descarregats de la base de dades GenBank (391) i representatius dels genotips A a J. Això permetria detectar les barreges de genotip del VHB, ja que dos variants de genotips diferents es tenen més del 7,5% de la seqüència de nt del seu genoma diferent entre ells (61), un percentatge àmpliament superior al 2% de canvis respecte la seqüència màster de la quasiespècies que s'ha utilitzat com a criteri per seleccionar un determinat haplotip. En l'apartat 4.3.2. Anàlisi de la quasiespècies del VHB en pacients amb recurrència post-trasplantament, es demostra que la regió de 330 pb analitzada en aquest estudi, en general separa correctament els principals genotips del VHB, però tot i això aquest mètode de genotipatge tampoc està exempt de possibles biaixos: la regió analitzada pot ser més similar a un determinat genotip que la resta del genoma degut al subgenotip, el patró específic de mutacions de cada variant o recombinació intergenotípica, molt freqüent en el VHB (390). En tot cas, entre els possibles biaixos d'aquest anàlisi es pot descartar el de la recombinació "in vitro" entre amplicons derivats de variants de

diferents genotips, ja que tots dos pacients van passar d'un 100% de "reads" de genotip D abans a un 100% de genotip A després de l'OLT, per tant no hi ha possibilitat de recombinació entre diferents genotips.

5.3. PERSPECTIVES DE FUTUR:

La resistència al tractament antiviral basat en NUCs, va representar un greu problema amb els NUCs de primera (LAM) i segona generació i (ADV i LdT) amb una probabilitat de seleccionar variants resistents a la seva acció elevada o mitja [baixa/mitja barrera genètica, veure 2.5.1. Resistència al tractament antiviral amb anàlegs de nucleòsids i nucleòtids (NUCs)] (484). No obstant, actualment aquest fenomen té poca rellevància amb els NUCs de nova generació (ETV i TDF), d'elevada barrera genètica (484). Tot i així, molts dels pacients actualment amb HBC han rebut NUCs de primera i segona generació al llarg del seu seguiment i han seleccionat variants amb sensibilitat reduïda o resistents a aquests tractaments antivirals. Aquest fet dificulta el seu tractament amb els NUCs de nova generació ja que l'activitat de ETV i TDF contra el VHB pot veure's disminuïda en comparació amb pacients no tractats prèviament (529,545). Per altra banda, ETV i TDF no són accessibles a gran part de la població de zones on l'HBC és altament prevalent com per exemple la Xina, on al 2010 s'estimava que hi havia uns 93 milions de pacients amb HBC (595) i l'ús de LAM i ADV és comú per motius econòmics. Per aquesta raó, la població immigrant provinent d'aquestes zones pot haver rebut aquests tractaments, fet que augmentaria el grup de pacients difícils de tractar. Així doncs, l'anàlisi per seqüenciació massiva del domini RT de la polimerasa viral, segueix sent útil en pacients pretractats amb NUCs per tal de determinar el tractament de rescat més adequat a la situació de la seva quasiespècies, al mateix temps que l'anàlisi de la regió del bucle antigènic del HBsAg pot proporcionar informació amb valor pronòstic de l'evolució de la malaltia hepàtica, especialment cap a HCC (440).

Per tal de continuar utilitzant les metodologies d'anàlisi de la quasiespècies desenvolupades en aquesta tesi caldrà adaptar-la a les noves plataformes de seqüenciació de tercera generació. L'augment de les longituds de lectura d'aquestes plataformes han fet la UDPS menys rendible, i per això el seu fabricant (Roche) ha anunciat que seran retirades del mercat a finals de 2016. Aquesta adaptació a una nova tecnologia suposarà un repte important que implicarà canviar de nou el sistema de filtratge dels "reads" obtinguts tenint en compte noves fonts d'error en la generació d'aquests. Moltes d'aquestes plataformes encara estan en fase d'avaluació, però sembla ser que oferiran prestacions que permetran superar algunes de les limitacions tècniques de les plataformes d'UDPS:

- En primer lloc, es reduiran els passos d'amplificació necessaris per seqüenciar les biblioteques d'amplicons (466). Tot i que l'aproximació ideal seria prescindir totalment de l'amplificació per PCR, eliminar alguns passos que involucren aquesta tècnica d'amplificació de l'ADN per reduir els errors i biaixos inherents a la PCR. Malgrat això, en créixer la mida dels "reads" és esperable una taxa d'error més elevada que les plataformes actuals (466,469) per tant serà necessari acotar les fonts d'error de les noves tecnologies de seqüenciació i buscar la manera d'optimitzar la creació i el processament de les biblioteques d'amplicons per minimitzar aquestes fonts d'error.
- En segon lloc, moltes d'elles permetran obtenir "reads" suficientment llargs com per analitzar el genoma sencer del VHB (3,2 Kb) en un sol amplicó, cosa que permetrà la caracterització completa de les variants de la quasiespècies viral. Això hagués estat especialment interessant en el segon estudi d'aquesta tesi, en el que s'hagués pogut analitzar en la mateixa variant la regió de solapament entre el domini RT de la polimerasa i el bucle antigènic de les proteïnes de superfície i la regió del BCP/EN2 que controla l'activitat dels promotors S1 i 2, que regulen la transcripció i per tant els nivells de proteïnes de superfície (235). En algunes de les mostres dels pacients trasplantats amb recurrència HBsAg negativa no hi havia alteracions a nivell de l'ORF S que justificuessin la manca d'expressió d'aquest antigen, i una possible hipòtesi seria que les alteracions estiguessin en aquesta altra regió reguladora del genoma, que a més també regula la síntesi del pgARN (219) cosa que al mateix temps podria explicar els baixos nivells de replicació d'aquests pacients. Aquesta hipòtesi està recolzada pel fet que les variants amb canvis en aquesta regió són més comunes en pacients immunosuprimits i trasplantats que en els pacients amb HBC (374). Per altra banda, en aquest segon estudi hagués permès realitzar una filogènesi amb el genoma sencer del VHB per tal de determinar-ne el genotip. Aquest és el mètode de classificació genotípica i subgenotípica del VHB més fiable (394) i evitaria els dubtes sobre els resultats causats per la necessitat d'extrapolar els resultats d'un fragment petit a tot el genoma viral, a més de permetre determinar el subgenotip dels pacients estudiats.

Així doncs, tot i els desafiaments tècnics d'aquestes noves plataformes el concepte d'estudi d'alta resolució de la quasiespècies del VHB per determinar mecanismes d'adaptació que encara no són coneguts segueix sent important. Aquests estudis permeten aprofundir en els coneixements sobre la biologia molecular del VHB, cosa que permet entendre millor els mecanismes de progressió de la malaltia hepàtica, o buscar dianes terapèutiques que ajudin a un control més eficient de la infecció o inclús a la seva "curació" amb l'aclariment del cccADN del nucli.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS:

1. Les tècniques de seqüenciació massiva basades en “ultra-deep pyrosequencing” (UDPS) permeten realitzar un mostreig molt més ampli de la quasiespècies del VHB (o de qualsevol quasiespècies viral) que les tècniques convencionals utilitzades prèviament per estudiar aquestes entitats: tècniques d’hibridació (com les d’hibridació reversa pels kits INNO-LiPA), anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP) i seqüenciació d’amplicons de la regió a estudiar (directa o poblacional i amb un pas previ de clonatge molecular).
2. L’ampli mostreig de les variants genètiques de les quasiespècies virals realitzat per UDPS permet detectar-ne en proporcions extremadament baixes (normalment en l’1% d’aquesta o per sota), i quantificar-ne les freqüències relatives amb un nivell de credibilitat més elevat que la seqüenciació directa amb un pas previ de clonatge molecular.
3. La creació de les biblioteques d’amplicons per PCR i la seqüenciació per UDPS són processos que generen variants “in vitro” mitjançant errors puntuals d’incorporació de nucleòtids, insercions i delecions o inclús recombinacions, durant diferents passos d’amplificació. Aquests artefactes poden alterar l’estructura original de les quasiespècies de manera que al final del procés de seqüenciació poden obtenir-se resultats molt esbiaixats.
4. Per tal d’evitar o minimitzar els errors introduïts les reaccions de PCR és necessari, en primer lloc, l’optimització de les condicions en que es porten a terme aquestes reaccions, especialment la polimerasa utilitzada. En segon lloc, cal un processament previ a l’anàlisi dels “reads” obtinguts mitjançant algorismes bioinformàtics que incloguin diferents etapes de filtratge, alineament i correcció d’errors.
5. L’anàlisi per UDPS de l’evolució de les freqüències de les variants d’una quasiespècies viral al llarg d’un procés (com el tractament amb NUCs) mitjançant paràmetres objectius (com la desviació estàndard de les freqüències de les variants al llarg del procés), permet fer inferències sobre el paper de les diferents variants de la quasiespècies al llarg d’aquest procés, de manera comparable a la dels assaigs fenotípics.
6. Les freqüències de les variants amb canvis d’aminoàcid relacionats amb la resistència a NUCs en pretractament superiors al 0,1% del total de la quasiespècies del VHB, no són un bon factor predictor de les freqüències de les variants que es seleccionaran al llarg del tractament amb NUCs. No obstant, l’estudi d’altres paràmetres virològics en pretractament mitjançant UDPS podria ajudar a preveure la resposta al tractament antiviral.

7. La UDPS no només permet estudiar les variants genètiques que formen la quasiespècies per separat, sinó també la variació global de tota la quasiespècies i la seva dinàmica al llarg del temps, enfront de diferents pressions selectives.
8. Tot i compartir la mateixa seqüència de nucleòtids els ORF P i S evolucionen de manera independent, de manera que la variabilitat de cada ORF està restringida en regions on hi ha motius importants per la funcionalitat dels productes que codifiquen. Així, en l'ORF S s'observa una tendència a conservar la seqüència "wild-type" en el determinant "a" (relacionat amb la secreció i infectivitat de les partícules virals), mentre que en l'ORF P, en absència de tractament antiviral, s'observa una tendència a conservar el motiu YMDD, que forma part del centre actiu del domini RT de la polimerasa.
9. L'anàlisi profund de la quasiespècies del VHB ha mostrat percentatges relativament alts de variants defectives, entre les que destaquen les que tenen codons stop prematurs a l'ORF S que podrien donar lloc a proteïnes trans-activadores. Aquesta presència sistemàtica a la quasiespècies viral suggereix un paper fisiològic per aquests productes, que no són codificats pel mecanisme canònic sinó per errors durant el cicle replicatiu del VHB, que resulten en un sistema de multicodificació de proteïnes que s'afegiria al del solapament d'ORFs.
10. Els sistemes de multicodificació basats en variants defectives es podrien sostenir gràcies a mecanismes de trans-complementació, que permetrien a les variants defectives utilitzar productes funcionals codificats per altres variants de la mateixa quasiespècies.
11. Les variants resistents al tractament amb NUCs tendeixen a acumular diferents mutacions relacionades amb la resistència al tractament antiviral, a excepció de les variants que seleccionen rtA181T, fet que suggereix que aquest canvi és suficient per si sol per conferir resistència/baixa sensibilitat al tractament antiviral amb NUCs de la família dels L-Nucleòsids i fosfonats acíclics i mantenir nivells relativament elevats de replicació viral.
12. A pesar de l'extracció directa del fetge infectat en pacients amb malaltia hepàtica terminal, i el trasplantament d'un nou fetge no infectat, el VHB pot romandre en l'hoste i re-infectar el nou fetge. No obstant el risc de recurrència de la replicació viral és baix amb tractament profilàctic continuat. En aquests casos, l'efecte coll d'ampolla sobre la quasiespècies del VHB, pot fer que es regeneri una quasiespècies amb una estructura completament diferent a la d'abans del trasplantament hepàtic.
13. La re-infecció del fetge per la variant "wild-type" del determinant "a", a pesar del tractament profilàctic i les recurrències del VHB amb HBsAg indetectable, suggereix que la recurrència

del VHB post-trasplantament també podria estar relacionada amb canvis a regions del seu genoma diferents de les que codifiquen les dianes terapèutiques dels tractaments profilàctics.

ANNEXOS

Ultra-Deep Pyrosequencing Detects Conserved Genomic Sites and Quantifies Linkage of Drug-Resistant Amino Acid Changes in the Hepatitis B Virus Genome

Francisco Rodriguez-Frías^{1,2*}, David Tabernero^{1,2}, Josep Quer^{2,3}, Juan I. Esteban^{2,3}, Israel Ortega⁴, Esteban Domingo^{2,5}, Maria Cubero^{2,3}, Sílvia Camós¹, Carles Ferrer-Costa⁶, Alex Sánchez^{4,7}, Rosendo Jardí^{1,2}, Melanie Schaper^{1,2}, Maria Homs^{1,2}, Damir Garcia-Cehic^{2,3}, Jaume Guardia^{2,3}, Rafael Esteban^{2,3}, Maria Buti^{2,3}

1 Biochemistry Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **3** Liver Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain, **4** Unitat d'Estadística i Bioinformàtica (UEB), Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain, **5** Centro Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO), CSIC-Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain, **6** Molecular Modelling and Bioinformatics Unit, Structural Biology Node, Institut de Recerca Biomèdica (IRB), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain, **7** Departament d'Estadística, Facultat Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

Abstract

Background: Selection of amino acid substitutions associated with resistance to nucleos(t)ide-analog (NA) therapy in the hepatitis B virus (HBV) reverse transcriptase (RT) and their combination in a single viral genome complicates treatment of chronic HBV infection and may affect the overlapping surface coding region. In this study, the variability of an overlapping polymerase-surface region, critical for NA resistance, is investigated before treatment and under antiviral therapy, with assessment of NA-resistant amino acid changes simultaneously occurring in the same genome (linkage analysis) and their influence on the surface coding region.

Methodology/Principal Findings: Serum samples obtained from chronic HBV-infected patients at pre-treatment and during sequential NA treatment with lamivudine, adefovir, and entecavir were analyzed by ultra-deep pyrosequencing (UDPS) using the GS-FLX platform (454 Life Sciences-Roche). The pre-treatment HBV quasispecies was not enriched with NA-resistant substitutions. The frequencies of this type of substitutions at pre-treatment did not predict the frequencies observed during lamivudine treatment. On linkage analysis of the RT region studied, NA-resistant HBV variants (except for rtA181T) were present in combinations of amino acid substitutions that increased in complexity after viral breakthrough to entecavir, at which time the combined variant rtL180M-S202G-M204V-V207I predominated. In the overlapping surface region, NA-resistant substitutions caused selection of stop codons in a significant percentage of sequences both at pre-treatment and during sequential treatment; the rtA181T substitution, related to sW172stop, predominated during treatment with lamivudine and adefovir. A highly conserved RT residue (rtL155), even more conserved than the essential residues in the RT catalytic motif YMDD, was identified in all samples.

Conclusions: UDPS methodology enabled quantification of HBV quasispecies variants, even those harboring complex combinations of amino acid changes. The high percentage of potentially defective genomes, especially in the surface region, suggests effective trans-complementation of these variants.

Citation: Rodriguez-Frías F, Tabernero D, Quer J, Esteban JI, Ortega I, et al. (2012) Ultra-Deep Pyrosequencing Detects Conserved Genomic Sites and Quantifies Linkage of Drug-Resistant Amino Acid Changes in the Hepatitis B Virus Genome. PLoS ONE 7(5): e37874. doi:10.1371/journal.pone.0037874

Editor: John E. Tavis, Saint Louis University, United States of America

Received: January 31, 2012; **Accepted:** April 25, 2012; **Published:** May 30, 2012

Copyright: © 2012 Rodriguez-Frías et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial, <http://www.cdti.es/>) (IDI-20110115) and the grants SAF2009-10403, P509/0899, PI10/01505 and PI11/01973 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (<http://www.micinn.es/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: frarodri@vhebron.net

Introduction

The hepatitis B virus (HBV) is a DNA virus that replicates via reverse transcription of an RNA intermediate [1] with rapid viral turnover ($>10^{11}$ virions per day) [2] and high mutation rates ($>10^{-5}$ nucleotide substitutions/site/year) [3], despite the ex-

remely high overlap of its coding regions [4]. Therefore, the virus circulates as a complex quasispecies, undergoing continuous changes due to competition and interactions between the genetic variants produced [5]. Chronic HBV infection (CHB) affects 350 million people worldwide and is a leading cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [6]. Currently, five oral nucleos(t)ide

analogues (NAs) are approved for CHB treatment in many parts of the world: lamivudine (LMV), adefovir-dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudine (LdT) and tenofovir (TDF) [6,7]. These drugs prevent viral replication by inhibiting the HBV reverse transcriptase (RT), but do not avoid formation of the covalently closed circular DNA (cccDNA), the main intracellular intermediate of HBV which is responsible for viral persistence, and they clear it at very slow rates [7–9]. Therefore long-term treatment is needed to maintain suppression of replication [8,9]. These therapies may result in selection of antiviral-resistant HBV variants from the HBV quasispecies pool over time, leading to treatment failure and disease progression. In treatment-naïve patients, selection of NA-resistant variants is highly probable with LMV, intermediate with ADV and LdT, and minimal or even zero with ETV and TDF, which are currently recommended as first-choice therapies against CHB [6,7].

Currently, identification of HBV genotypic NA resistance is mainly performed by PCR amplification and Sanger sequencing or the INNO-LiPA line probe reverse hybridization assay (LiPA), which detect NA resistance amino acid (aa) substitutions present in the HBV quasispecies in proportions of 20% and between 5%–10%, respectively [7]. With these methods the frequencies of each mutation cannot be measured, and it is impossible to determine whether several mutations are combined in the same sequence (mutation linkage). This is an important limitation because the addition of compensatory or secondary NA resistance aa substitutions to primary resistance substitutions in NA-resistant genomes (which usually reduce their replication efficiency in relation to wild-type variants), may enhance the replication of these genomes or even give rise to multidrug resistant (MDR) variants [10,11]. As an alternative to LiPA and direct sequencing, molecular cloning enables analysis of single DNA molecules, thereby surpassing the detection limits of the other techniques. Nevertheless, this methodology is complex and time-consuming because analysis of at least 100 clones is required to detect variants present in 1% of the quasispecies. These limitations can now be overcome by ultra-deep pyrosequencing (UDPS) technology based on the GS-FLX platform (454 Life Sciences-Roche), which enables quantitative analysis of thousands of clonally amplified sequences [12] up to 400 nucleotides (nts) in length. With this technique, minor variants in the HBV quasispecies can be detected and quantified, including those with combinations of changes in the same sequence. In HIV infection, UDPS has been used to detect clinically relevant minority drug-resistance mutants with much higher sensitivity (<1%) than cloning [13,14]. It has been suggested that quantification of minor drug-resistance mutants in treatment-experienced HIV-infected patients may be helpful when planning subsequent antiretroviral regimens [15]. A similar approach has been used to analyze HBV quasispecies in the RT and the overlapping hepatitis B surface antigen (HBsAg) coding regions in drug-naïve (untreated) and drug-resistant patients [16,17]. However, the simultaneous presence of various NA resistance-related aa substitutions in the same genome was not analyzed.

In the present study, a coding region where HBV polymerase (P) and surface (S) open reading frames (ORFs) overlap was clonally analyzed by UDPS with standard GS-FLX technology (the only method available when the study was designed), which allows sequencing of DNA fragments up to 250 bp in length, including the fusion primers (see Patients and Methods). The region analyzed extends from codon rt148 to rt208 in the P ORF, which includes most RT codons corresponding to reported relevant NA-resistant aa substitutions (rtI169T, rtV173L, rtL180M, rtA181T/V, rtI184S/A/I/L/G/C/M, rtA194T,

rtA202C/G/I, rtM204V/I [7], rtW153Q [18], rtV191I [19] and rtV207I [20]), and spans a part of the S ORF, from codon s140 to s200, containing the C-terminal region of the immunodominant epitope “a determinant” (codon s124 to s147) (Figure 1). This was done to exploit the capability of UDPS technology to quantify variants in extremely low percentages in the viral quasispecies in order to study the variability of the overlapping coding region before NA treatment and during sequential treatment. Our rationale for performing this research was that in the absence of antiviral treatment, ultra-deep analysis of the variability in this region might identify conserved positions in the RT region with a potentially essential functional role in the HBV polymerase and would be helpful to establish whether the percentage of HBV NA-resistant variants in the baseline quasispecies could predict their subsequent selection by a particular NA treatment. Furthermore, during sequential NA treatment, the ability of UDPS to analyze clonally amplified sequences would enable study of the simultaneous presence of various aa substitutions (linkage analysis) related to treatment failure in the same genome and detection of enrichment in MDR variants. This is of particular relevance in LMV resistance, which increases the probability of developing cross-resistance to subsequent treatments with ETV or ADV [21–24]. In addition, enrichment of the HBV quasispecies in MDR variants could result in changes in epitopic regions of HBsAg that could potentially affect virion assembly, stability or infectivity, owing to the complete overlap between the P and S ORFs [4,25]. Thus, aa substitutions present in the S ORF were also studied to determine the influence of MDR variant enrichment.

Results

A total of 350 744 reads from 8 serum samples were obtained after filtering the UDPS results with the GS-Amplicon-Variant-Analysis software included in GS-FLX platform. To increase the sensitivity and accuracy of UDPS, these reads were additionally filtered by an automated computational algorithm that excluded those likely to contain artifactual single-base changes based on Poisson distribution [13]. By this approach, 245 565 reads (13 670 to 62 450 per sample) were validated. In each sample, the most highly represented nucleotide sequence was designated “master”. Alignment between these master sequences is shown in Dataset S1, and translations into amino acids in the P and S ORFs are shown in Dataset S2 and Dataset S3, respectively.

UDPS analysis of pre-treatment patient samples

A total of 141 581 validated reads were obtained from the 4 pre-treatment patient samples (1, 2, 3 and 4A). In each sample, the master sequence matched the consensus sequence obtained by Sanger method. Each validated read was aligned with the master sequence from the corresponding sample to calculate the frequency of each aa change relative to the master. Using this method, we found that the frequency of aa substitutions associated with NA treatment resistance was not significantly different from that of the remaining aa changes; the differences approached significance only in patient 4 ($P=0.09$) (Table 1). On calculation of the average percentage of each aa change in the 4 baseline populations, 13 changes were found at average frequencies of $\geq 0.1\%$ (Table S1), and 4 of them are known to confer NA resistance: rtA181T (0.10%), rtV191I (0.23%), rtA194T (0.11%), and rtM204I (0.15%). The dominant sequence in patient 2 was accompanied by around 5% of sequences carrying substitutions rtH148Y, rtR153W, rtI187L and rtL199V (Figure 2). In addition, substitutions rtD205N and rtD206N, both of which affect essential

Table 1. Enrichment in amino acid changes related to nucleos(t)ide analog resistance in the pre-treatment quasisppecies.

Patient (sample)	Resistance-related aa changes (Mean frequency)	Other aa changes (Mean frequency)	P-value
1 (N = 32 737)	0.04	0.06	0.42
2 (N = 13 670)	0.09	0.07	0.99
3 (N = 62 450)	0.06	0.05	0.53
4 (4A) (N = 32 724)	0.08	0.03	0.09

aa, amino acid; N, number of reads obtained by ultra-deep pyrosequencing. The mean frequency of amino acid changes related to nucleos(t)ide analog resistance (rtI169T, rtV173L, rtL180M, rtA181T/V, rtT184S/A/I/L/G/C/M, rtA194T, rtA202C/G/I, rtM204V/I [7], rtW153Q [18], rtV191I [19] and rtV207I [20]) obtained by ultra-deep pyrosequencing at pre-treatment was compared with the mean frequency of the remaining amino acid changes. doi:10.1371/journal.pone.0037874.t001

significant aa deletions. In fact, 8 of the 21 substitutions led to a stop codon, which, taken together, represented 0.98% to 2.1% of the 4 baseline viral populations. Four of these 8 stop codons affected RT positions associated with NA resistance (sW172*

related to rtA181T, sW182* to rtV191I, sW196* to rtM204I, and sW199* to rtV207I), at frequencies of 0.20% to 0.30%, significantly higher than the artifactual error (0.03%).

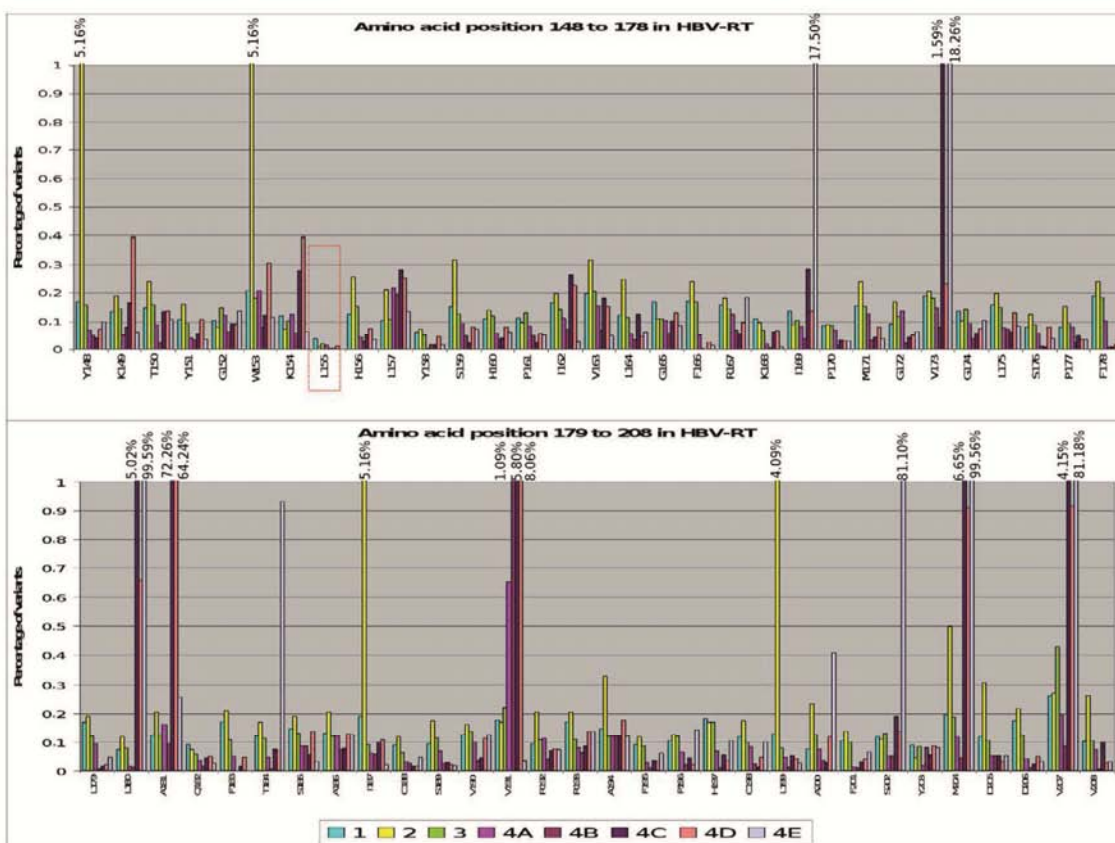


Figure 2. Overall frequency of amino acid substitutions at each reverse transcriptase position. Each bar represents the sum of frequencies of all amino acid changes occurring in each reverse transcriptase position. Each bar with a different color in the same position corresponds to one of the 8 samples studied in the 4 patients. Among these positions rtL155 (framed in red) was the least variable. Samples 1, 2, 3, 4A and 4B were obtained prior to antiviral treatment, whereas samples 4C, 4D and 4E correspond to completion of lamivudine, adefovir, and entecavir treatments, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0037874.g002

Table 2. Relationship between frequencies of lamivudine resistance-related amino acid changes detected at pre-treatment and their selection at lamivudine viral breakthrough in the four patients.

Patient (sample)	RT aa changes	Pre-treatment relative frequency by UDPS (%)	Selection at LMV VBK
1 (N = 32 737)	rtL180M	0	No
	rtA181T	0.07	No
	rtM204I	0.07	No
	rtM204V	0.06	No
2 (N = 13 670)	rtL180M	0	LiPA & Seq
	rtA181T	0.18	No
	rtM204I	0.35	No
	rtM204V	0.09	LiPA & Seq
3 (N = 62 450)	rtL180M	0	LiPA & Seq
	rtA181T	0.07	No
	rtM204I	0.09	No
	rtM204V	0.05	LiPA & Seq
4 (4A) (N = 32 724)	rtL180M	0	LiPA
	rtA181T	0.09	LiPA & Seq
	rtM204I	0.08	No
	rtM204V	0	LiPA

aa, amino acid; LiPA, INNO-LiPA HBV DR v2 assay; LMV, lamivudine, N, number of reads obtained by UDPS; RT, reverse transcriptase; Seq, direct sequencing; UDPS, ultra-deep pyrosequencing; VBK, virologic breakthrough (increase in serum HBV-DNA levels, confirmed by real-time PCR, of at least 1 log₁₀ IU/mL compared with the lowest value during NA treatment [6]).

Comparison between the relative frequencies of lamivudine-resistant variants detected by UDPS at pre-treatment and their subsequent detection by reverse hybridization (INNO-LiPA HBV DR v2 assay) and/or direct sequencing at lamivudine viral breakthrough in the four patients.

doi:10.1371/journal.pone.0037874.t002

UDPS analysis of conserved amino acid residues

Assessment of the frequencies of synonymous (ds) nt changes (which do not imply an aa change) and non-synonymous (dn) nt changes (which imply an aa change) in the P ORF of the 4 pre-treatment samples (Table S2) revealed 16 conserved positions with a dn \leq 0.1%, among which only residue rtL155 showed a dn $<$ 0.03% (virtually unchanging) at pre-treatment and during treatment (Figure 2). In the essential YMDD catalytic motif, only residue rtY203 was included within the 16 positions, whereas rtD205 and rtD206 showed relatively high variability, an unexpected finding considering their essential role in polymerase catalytic activity [28]. In the S ORF, ten positions showed a dn \leq 0.1% (Table S2). Three of them were located in the “a determinant”: sP142 and sN146, associated with viral infectivity [29], and sC147, a cysteine critical for secretion of HBV particles [30]. Other potentially essential positions included in the fragment analyzed, such as sS174, proposed as a “hot spot” for Surface/Core protein-to-protein interactions based on a predicted 3Dmodel of the surface protein [30], were not among the most highly conserved.

To evaluate the relative variability of the P and S ORFs along the region analyzed, we subtracted the percentage of variability of the S region from the percentage of variability of RT region. This calculation was performed taking into account that any change in the first nt of the P codons affects the third nt of the overlapping S codon (P₁/S₃), while the second and third nts of P affect the first and second nts of the overlapping S codon (P₂₃/S₁₂). In both calculations (P₁/S₃ and P₂₃/S₁₂), S was more variable than P. Moreover, P₁/S₃ showed that in the C-terminal end of the UDPS-analyzed fragment (rtR192-rtV208 corresponding to sV184-sY200), which includes the YMDD catalytic domain, the P ORF was significantly better conserved than the S ORF, whereas in the

N-terminal end (rtY148-rtY158 corresponding to sT140-sI150), which includes several residues important for viral infectivity such as those of the “a determinant” [29,31], the S protein was more highly conserved (Figure 3).

Longitudinal UDPS analysis of serum samples from a patient with multidrug resistance during sequential therapy

A total of 136 708 validated reads corresponding to 5 serial samples from patient 4, (4A and 4B at pre-treatment and 4C to 4E in sequential treatment) were analyzed. The most variable RT aa substitutions in the 5 samples, sorted by decreasing SD value, are shown in Table 3. The 10 most variable substitutions (highest SD value), rtL180M, rtM204V, rtS202G, rtV207I, rtA181T, rtV173L, rtI169T, rtV191I, rtM204I and rtI184A, are known to be associated with NA resistance. Interestingly, immediately after these well known NA-resistant variants, in positions 11 and 12, we found the rare variants rtA181S and rtA200V, which are associated with ADV and L-nucleoside analogue (LMV and LdT) resistance, respectively [32]. In contrast, rtR153Q and rtA194T, also associated with NA resistance, were less variable (positions 25 and 26 in Table 3).

Changes occurring in the HBV quaspecies of the RT region studied over a 42-month period in the absence of treatment were assessed by comparative UDPS analysis of samples 4A and 4B. The consensus sequence was identical in both samples and the variants showed low comparative changes in frequency, except for rtV191I, which increased from 0.6% (4A) to 1.1% (4B) (Table 3). At the time of LMV VBK (sample 4C), percentages of rtA181T (71.7%), rtM204V (5.6%), and rtL180M (5%) notably increased relative to baseline samples, as did other LMV resistance substitutions, particularly rtV191I (5.8%), rtV207I (3.9%), and

Table 3. Frequencies of amino acid substitutions with the highest variability during sequential treatment in each of the five treatment samples.

Amino acid substitutions	4A	4B	4C	4D	4E	SD
L180M	0	0.01 ⁿ	5.02	0.6	99.3	48.8
M204V	0.02 ⁿ	0	5.6	0.7	99.4	48.7
S202G	0	0.02 ⁿ	0.15	0.08	80.9	40.4
V207I	0.01 ⁿ	0.02 ⁿ	3.9	0.8	80.9	39.7
A181T	0.09	0.05	71.7	64	0.23	39.2
V173L	0.05	0.04	1.4	0.13	18.2	8.9
I169T	0	0	0.04	0	17.3	8.7
V191I	0.59	1.09	5.8	8.0	0.02 ⁿ	3.8
M204I	0.08	0.03	1	0.09	0	0.5
T184A	0.01 ⁿ	0	0.04	0.06	0.91	0.44
A181S	0.02 ⁿ	0.01 ⁿ	0.47	0.23	0	0.22
A200V	0.02 ⁿ	0.01 ⁿ	0.01 ⁿ	0.04	0.38	0.18
I162T	0.08	0.06	0.18	0.16	0	0.08
K149N	0.02 ⁿ	0	0.06	0.17	0	0.08
L157M	0.19	0.14	0.19	0.16	0.02 ⁿ	0.08
K154Q	0.05	0.01 ⁿ	0.05	0.18	0.06	0.08
R153W	0.06	0.01 ⁿ	0.05	0.18	0.03	0.07
V163I	0.10	0.04	0.17	0.14	0.03	0.07
V173M	0.07	0.04	0.15	0.10	0	0.06
K154T	0.01 ⁿ	0.03	0.10	0.13	0	0.06
I169L	0.03	0.03	0.15	0.12	0.08	0.06
R167H	0.06	0.03	0.02 ⁿ	0.04	0.12	0.05
V207M	0.13	0.05	0.04	0.07	0.12	0.04
G152R	0.08	0.04	0.04	0.03	0.11	0.03
R153Q	0.13	0.06	0.06	0.12	0.07	0.03
A194T	0.07	0.07	0.05	0.10	0.06	0.02
NUMBER OF SEQUENCES	32724	35662	25289	19740	23249	

SD, standard deviation;

ⁿ, Frequencies below the mismatch error rate (0.03%).

Frequencies of reverse transcriptase amino acid substitutions with the highest variability during sequential antiviral treatment, according to their standard deviation, in the 5 samples analyzed in patient 4 (4A and 4B correspond to pre-treatment, and 4C, 4D and 4E correspond to completion of lamivudine, adefovir, and entecavir, respectively). Substitutions are arranged in descending order, from the most to the least variable. Frequencies of substitutions $\geq 0.1\%$ in any sample are shown in bold. Substitutions selected for linkage analysis are shown in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0037874.t003

rtV173L (1.4%), although to a lesser extent. The ETV-associated substitution rtS202G also increased slightly (0.15%) (Table 3). At the end of ADV (sample 4D), rtA181T, which was detected by LiPA, remained as the major variant (64%) (Table 3 and Figure 4), whereas rtV191I (8%) continued increasing. Moreover, the number of minor substitutions with frequencies $\geq 0.1\%$ increased with respect to LMV VBK (Table 3). At ETV VBK (sample 4E), two variants previously detected by LiPA at LMV VBK were strongly selected, rtL180M (99.3%) and rtM204V (99.4%) (Table 3 and Figure 4). In addition, other NA-resistant variants related with resistance to ETV and detected by Sanger sequencing also increased significantly at ETV VBK: rtV173L (18.2%), which was detectable by LiPA, rtS202G (80.9%) and rtI169T (17.3%),

inconsistently observed by Sanger [22] (Table 3 and Figure 4). We also observed an increase in other NA-resistant variants that have not been previously related to ETV resistance, such as rtV207I (80.9%), detected by Sanger sequencing, and the rare substitution, rtA200V (0.38%) (Table 3 and Figure 4).

In the overlapping S ORF, 51 aa substitutions were present at frequencies $\geq 0.1\%$ in at least one of the 4A to 4E samples (data not shown). The most variable positions were those that overlapped RT residues associated with NA resistance, particularly sI195M, related to rtM204V, present in 5.6% and 99% of sequences at LMV VBK and ETV VBK, respectively. As observed in the baseline quasispecies, a significant portion of the 20 most frequent variants (highest average substitution frequencies in the 5 samples) led to stop codons (sW156*, sW172*, sW182*, sW191*, sW196* and sW199*), especially at LMV VBK and at the end of ADV, mainly due to mutation sW172*, related to rtA181T, (71.7% and 64%, respectively) and sW182*, related to rtV191I, (5.8% and 8%, respectively). The total frequency of genomes carrying a stop codon was 80%, 74%, and 4.4% at LMV, ADV, and ETV VBK, respectively. These 20 variants did not include the immune escape variant sG145R, detected in relatively high frequencies at pre-treatment, but otherwise included the variants sS167L, sW172C, and sW172*, located at the minimal recognized sequence (positions s165 to s172) of the TH-s156/s175 epitope [27]; among these, sS167L showed a continuous percentage increase from pre-treatment to ETV-VBK (sample 4A: 0.2%, 4B: 0.7%, 4C: 1.1%, 4D: 1.3%, 4E: 4%).

For each sample, nt and aa divergences were assessed as the percentage of sequences different from the master sequence in the first baseline sample (sample 4A), and as the percentage of sequences different from each sample's master sequence. In each quasispecies, nt divergence was always higher than aa divergence in both analyses. Nucleotide divergence in relation to the baseline master sequence was similar in both pretreatment samples (9.72% and 8.23%), but significantly increased during antiviral treatments (82.5% after LMV, 70.84% after ADV and 99.69% after ETV). Amino acid divergence was higher in the S ORF than in P in both pre-treatment samples using both calculations, but under antiviral treatments, aa divergence in the S ORF continued higher than in the P ORF when related to the master sequence of each sample, while they tended to equalize in relation to the baseline master sequence (Table 4).

UDPS linkage analysis to establish the combination of the most variable residues in the same sequence

The 10 most variable RT substitutions observed during sequential NA treatment, blindly selected after SD sorting and all associated with NA resistance (rtL180M, rtM204V, rtS202G, rtV207I, rtA181T, rtL173V, rtI169T, rtV191I, rtM204I, and rtT184A) (Table 3), were included in the linkage analysis. Among all their possible combinations, the sequence with no mutations in these positions (baseline combination: BC) showed the highest variability during NA treatment. This BC sequence was largely dominant at pre-treatment (98.5%), but greatly decreased at VBK during sequential NA treatment, especially at ETV VBK (0.3%) (Table 5 and Figure 5).

Linkage analysis yielded two main findings: First, the 10 most variable aa substitutions were mainly present in variant combinations, the only exception being rtA181T, which was the single substitution in 64.1% of sequences at LMV VBK and 56.5% at the end of ADV (Table 5). This substitution was also found in combination with rtV191I in a significant percentage of variants (4.4% at LMV VBK and 6.6% at ADV end) (Table 5). Second, at ETV VBK, rtI169T and/or rtS202G, which are typically

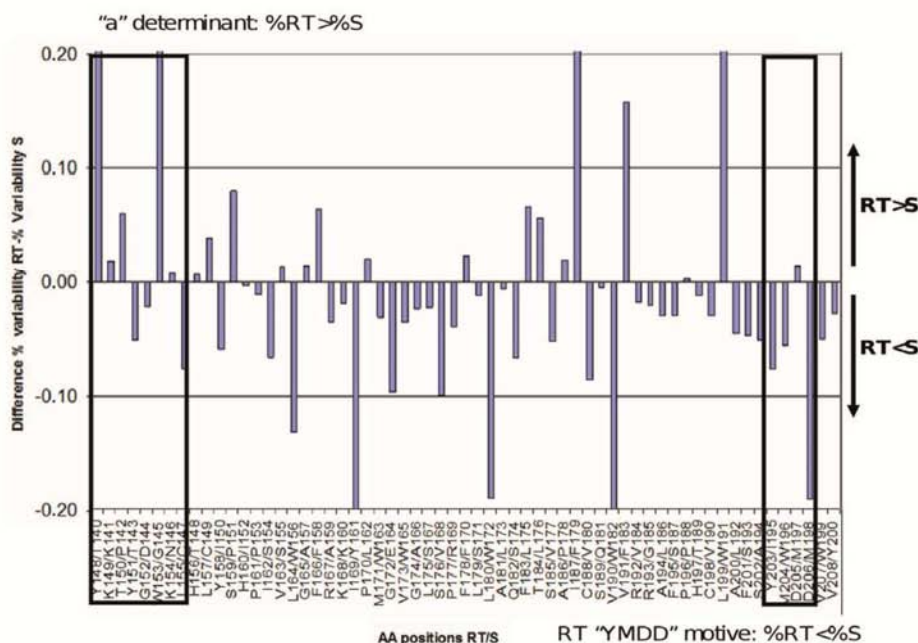


Figure 3. Differences in variability throughout the fragment of reverse transcriptase and overlapping surface region analyzed. In the pre-treatment samples (1 to 4A), each bar represents the difference between the average frequency of amino acid substitutions in each reverse transcriptase (RT) position and its overlapped amino acid in the surface (S) region, assuming that any substitution in the first nucleotide of an RT codon affects the third nucleotide of the overlapping S codon. Bars with positive values indicate positions with a higher tolerance for amino acid substitutions in RT than in S, whereas the opposite is indicated by bars with negative values. doi:10.1371/journal.pone.0037874.g003

associated with ETV resistance, always appeared linked to the LMV resistance signature (rtL180M-rtM204V), in keeping with previous reports [22] (Table 5), whereas rtV207I, which has not been previously associated with ETV resistance, unexpectedly appeared in most of the highly frequent combinations and always together with other variants, especially rtM204V (Table 5). In order to confirm whether the association of rtV207I and rtM204V was specific to this patient or a more general phenomenon, results from a first-generation LiPA strip (which included NA resistance-related substitutions in codons rt204 and rt207 [33]) of 50 patients who had failed LMV treatment were retrospectively checked. Thirty-nine percent of them showed rtV207I and rtM204V/I (data not shown). Three patients carrying rtM204V and rtV207I had been subsequently treated with ETV, and two of them had rapid VBK after an initial ETV response.

The predominant presence and complexity of the combined aa substitutions was particularly evident at ETV VBK, in which the main variant combination was rtL180M-202G-204V-207I (72.4%), followed by rtI169T-173L-180M-204V (10%) and rtI169T-173L-180M-202G-204V-207I (4.6%) (Table 5 and Figure 5). To support the reliability of the frequencies of combinations detected, the 4E sample was analyzed by molecular cloning. In an analysis of 23 clones, the rtL180M-202G-204V-207I combination was also the most prevalent (65% of clones), followed by rtI169T-173L-180M-204V (22%), and rtL180M-204V (13%). UDPS showed that many of the most prevalent combinations detected at ETV VBK were present in $\geq 0.1\%$ at LMV VBK, such as: rtL180M-202G-204V-207I (0.1%), rtL180M-204V (0.3%), rtL180M-204V-207I (1.4%), and rtL173L-180M-204V (0.6%) (Table 5 and Figure 5). Among them, combined variants carrying only LMV resistant mutations,

such as rtV173L-rtL180M-rtM204V and rtL180M-rtM204V, increased in frequency from LMV to ETV VBK (from 0.6% to 1.3% and from 0.3% to 3.2%, respectively) (Table 5 and Figure 5).

Discussion

Massive UDPS analysis enabled sensitive baseline detection of minor viral populations associated with NA resistance, as has been reported [34], and identification of highly variable and conserved residues. In addition, UDPS proved to be a powerful technique for quantitative study of the dynamics of HBV populations resulting from the multiple evolutionary pressures of sequential NA therapy. The capability to clonally analyze thousands of sequences disclosed combinations of aa substitutions occurring in the same genome during antiviral treatment.

Identification of mutations in extremely low percentages with an acceptable degree of confidence is limited by the number of independent template molecules obtained from the sample analyzed, the coverage or number of reads obtained per base, and the number of artifactual errors generated during PCR amplification and pyrosequencing [13]. For these reasons, all the samples selected for the current study carried a high HBV viral load ($>10^5$ IU/mL), and the high-fidelity DNA polymerase Pfu turbo linked to a Poisson-based computational algorithm [13] was used to bypass the artifactual errors. With this approach, variants comprising as little as 0.03% of the HBV quaspecies could be detected. UDPS analysis showed that aa changes known to be associated with NA resistance above this detection limit (rtA181T, rtV191I, rtA194T and rtM204I) were present in low percentages (ranging from 0.07 to 0.59) in the baseline HBV quaspecies,

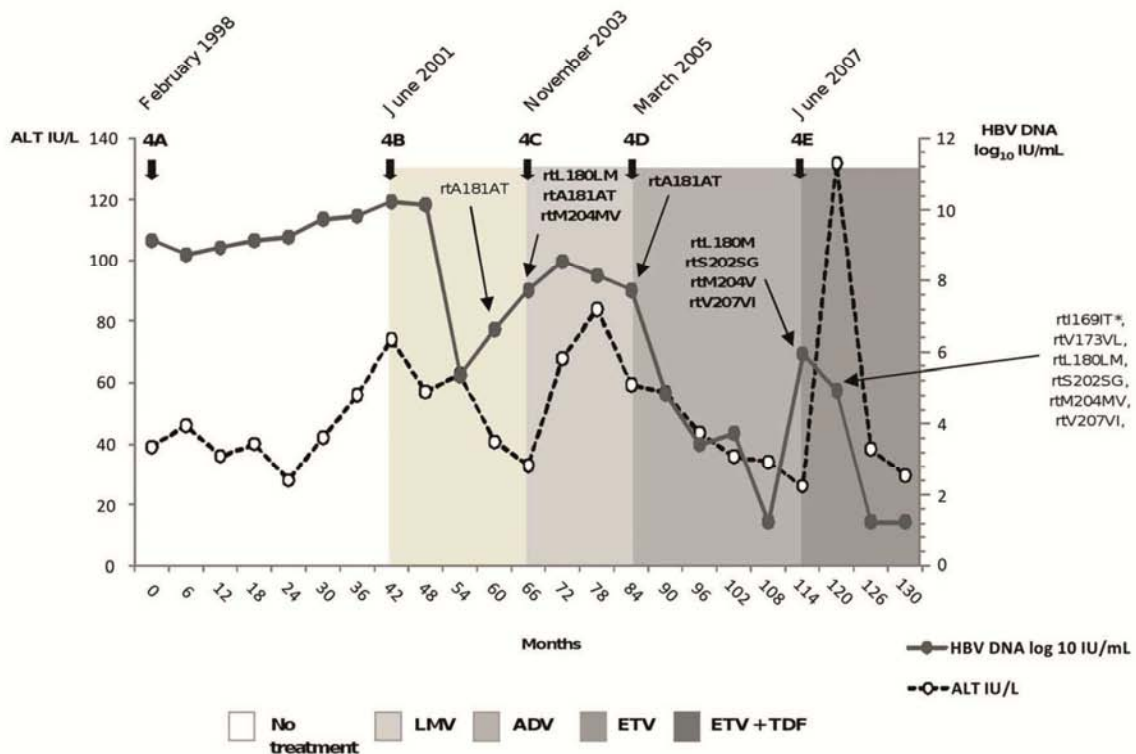


Figure 4. Longitudinal virologic and biochemical outcome of patient 4. Thick arrows indicate the sampling time and thin arrows specify mutations detected by reverse hybridization (INNO-LiPA HBV DR v2 assay) and/or direct sequencing, which are shown in bold in samples analyzed by UDPS. * This variant was not consistently observed by Sanger sequencing. doi:10.1371/journal.pone.0037874.g004

probably representing a background due to the natural dynamics of the viral quasispecies. Moreover, variant combinations were not

detected in the baseline quasispecies. These results suggest that if the resistance changes were present (which seems likely because of their strong selection in the longitudinally analyzed patient 4), they would be in percentages below the detection limit. Therefore, higher sensitivity than is reported here seems to be required for detecting combined variants at baseline. In the sequentially treated patient, the relative frequency of NA-resistant substitutions in the baseline quasispecies did not seem to be predictive of subsequent LMV treatment outcome or RT variants selected at VBK.

The high sensitivity of UDPS also made possible identification of conserved residues. The residue rtL155 was found to be the most highly conserved at both pre-treatment and throughout sequential treatment, a previously unreported finding. According to a structural analysis based on a 3Dmodel of HBV RT [35], this leucine residue is located at the external surface of RT (Figure S1), and has high hydrophobicity, features that suggest a role in protein-to-protein interactions. The low overall frequency of aa substitutions in rtL155 was even lower than that observed in residues deemed essential for viral polymerase function, such as rtY203, rtD205 and rtD206 from the conserved YMDD catalytic motif [28,36]. Considering the essentiality of rtD205 and rtD206, which are part of the catalytically essential aspartic acid triad of HBV RT [28], a higher than expected variability was found (>0.1% in one case). In this sense, it has been reported that substitutions in rtD205 result in replication-defective HBV variants that can be trans-complemented in vitro by wild-type

Table 4. Nucleotide and amino acid divergences in the S and P ORFs in each sample from patient 4.

	4A	4B	4C	4D	4E
Baseline Master					
NT Master	9.72	8.23	82.50	70.84	99.69
P Master	7.60	5.57	82.03	69.70	99.69
S Master	9.64	7.34	80.59	70.37	99.67
Sample Master					
NT Master	9.72	8.23	41.63	51.33	35.53
P Master	7.60	5.57	39.65	48.17	31.01
S Master	9.64	7.34	41.05	50.56	33.95

NT Master, nucleotide master sequence; P Master, amino acid master sequence in polymerase (P) ORF; S Master, amino acid master sequence in surface (S) ORF. Nucleotide and amino acid divergences in samples from patient 4 (4A and 4B correspond to pre-treatment, and 4C, 4D and 4E correspond to completion of lamivudine, adefovir, and entecavir, respectively). In each sample, divergences were calculated as the percentage of all sequences different from the master of the first baseline sample processed (sample 4A) (Baseline Master), and the percentage of all sequences different from the master of the sample where they were obtained (Sample Master). doi:10.1371/journal.pone.0037874.t004

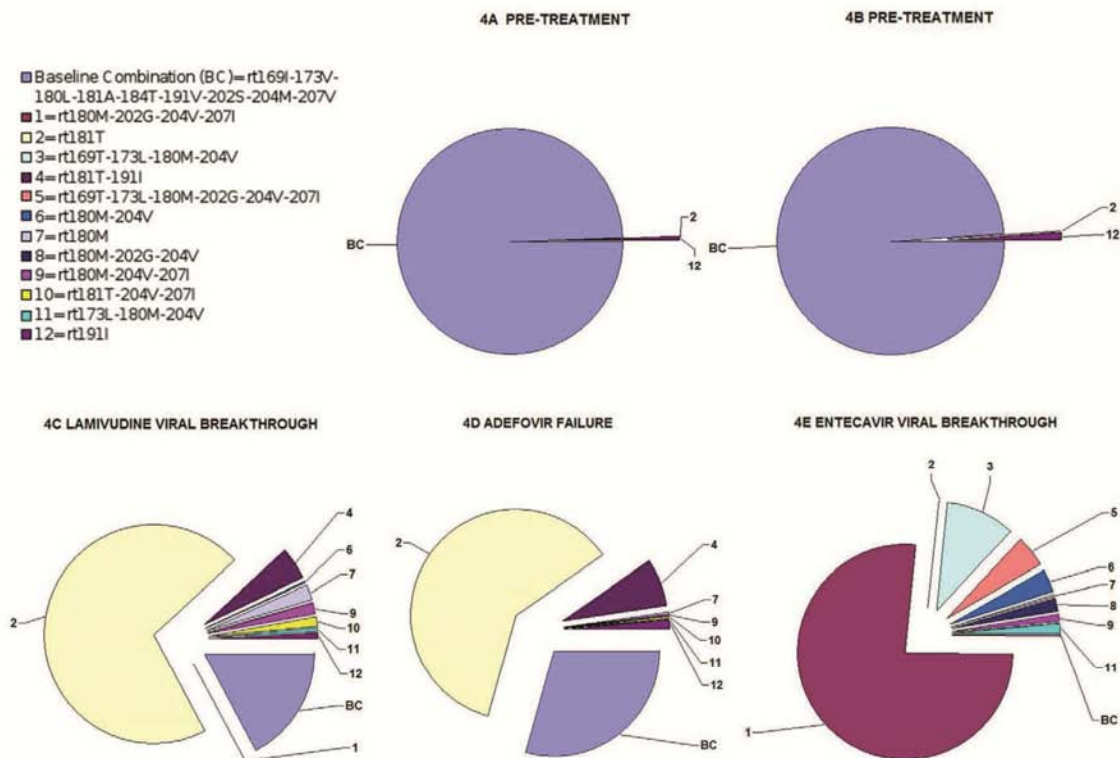


Figure 5. Changes in percentages of reverse transcriptase variants during follow-up of patient 4. Frequencies of the most variable variants in the 5 samples from patient 4 (ie, those detected in frequencies $\geq 1\%$ by linkage analysis in any of the samples) are shown in a pie chart for each sample. Each variant has been numbered as sorted in Table 5 (by decreasing SD of the frequency), except for the variant with no mutations in any of the positions included in the analysis. This variant, which was the most variable of all, is designated *baseline combination*. doi:10.1371/journal.pone.0037874.g005

polymerases [37–39]. This mechanism may explain the finding of genomes with aa substitutions in rtD205, which may replicate through trans-complementation with a helper wild-type HBV polymerase in the same hepatocyte.

The HBV genome has an extremely overlapping structure [4]. With UDPS, we were also able to study epitopic regions of the S ORF that overlap the RT region. In the baseline viral populations, the S ORF showed significant percentages of substitutions that lead to a stop codon (1%–2%). These mainly overlapped RT positions related to NA resistance variants, and some of them delete important envelope residues involved in viral infectivity and/or possible interactions with core proteins [29,30]. The envelope stop codon variant sW172*, which is related to the major NA-resistant variant rtA181T, became the most highly represented following LMV and ADV treatments, yielding a major viral population that is defective in secretion of viral particles, as reported by Warner et al. [23]. This strongly suggests that secretion of genomes harboring the sW172* substitution would be enabled by trans-complementation with a functional S protein from other HBV genomes occurring in the same quasispecies, as previously suggested [24]. Trans-complementation of envelope-defective variants may be favored by the huge excess of HBsAg production during chronic infection (1000- to 10 000-fold excess in relation to complete viral particles) [40]. Thus, envelope-competent genomes might produce enough HBsAg for their own

envelops and those of the defective genomes, even as minor viral populations. These findings suggest that the large excess of HBsAg may have evolved to offset the presence of envelope stop codons.

Regarding the relative variability of the P and S ORFs, we found that the N-terminal region (rtY148-rtY158 corresponding to sT140-sI150) included in the “a determinant”, which is the main target for anti-HBs neutralizing antibody [41,42], was more conserved in the S than in the P ORF. This may be explained by the close relationship of this epitope with infectivity [31]. Moreover, the only variant found in proportions above 0.1% was the well-known immune escape substitution sG145R [26], which modifies the antigenicity of the “a determinant”, while viral particles remain infective [29]. Interestingly, despite the relevance and high degree of conservation of the “a determinant”, RT residue rtL155 was more highly conserved than its overlapped amino acids in the S ORF, sN146 and sC147, both essential for the structure and function of this determinant [29,30]. Contrary to what was observed for the N-terminal region, in the C-terminal (rtR192-rtV208 corresponding to sV184-sY200), where the essential YMDD motif of RT is located, the P ORF was more conserved than the S ORF. These observations support the notion that although the polymerase and surface proteins share the same nt sequence, they evolve independently to preserve their essential functions, as reported by van Hemert et al. [30].

Table 5. Linkage analysis of the most variable amino acid substitutions during sequential treatment.

Combined variants	4A	4B	4C	4D	4E	SD
169I-173V-180L-181A-184T-191V-202S-204M-207V (BC)	98.54	98.51	19.60	33.80	0.30	43.5
180M-202G-204V-207I	0.00	0.00	0.10	0.01 ⁿ	72.36	36.2
181T	0.09	0.05	64.08	56.45	0.10	34.9
169T-173L-180M-204V	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00	5.0
181T-191I	0.00	0.00	4.39	6.57	0.01 ⁿ	3.3
169T-173L-180M-202G-204V-207I	0.00	0.00	0.01 ⁿ	0.00	4.59	2.3
180M-204V	0.00	0.00	0.28	0.01 ⁿ	3.20	1.6
180M	0.00	0.00	1.94	0.27	0.11	0.9
180M-202G-204V	0.00	0.00	0.00	0.00	1.82	0.9
180M-204V-207I	0.00	0.00	1.38	0.22	1.19	0.7
181T-204V-207I	0.00	0.00	1.24	0.18	0.00	0.6
173L-180M-204V	0.00	0.00	0.59	0.05	1.26	0.6
191I	0.59	1.08	0.78	1.32	0.00	0.6
173L-180M-184A-204V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.4
169T-180M-202G-204V-207I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.76	0.4
169T-173L-180M-204V-207I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.74	0.4
181T-204V	0.00	0.00	0.75	0.07	0.00	0.4
173L-180M-202G-204V-207I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.3
204V-207I	0.00	0.00	0.57	0.11	0.00	0.3
173L-180M	0.00	0.00	0.55	0.06	0.00	0.3
169T-180M-184A-202G-204V-207I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.53	0.3
204V	0.02 ⁿ	0.00	0.47	0.06	0.00	0.2
204I	0.08	0.03	0.43	0.02 ⁿ	0.00	0.2
169T-173L-180M-184A-204V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.2
173L-180M-184A-202G-204V-207I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36	0.2
181T-207I	0.00	0.00	0.26	0.21	0.00	0.1
169T-180M-204V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26	0.1
181T-204I	0.00	0.00	0.26	0.07	0.00	0.1
169T-173L-180M-202G-204V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.1
180M-184A-204V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.1
169T-173L-180M-184A-202G-204V-207I	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.1
204I-207I	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.1
207I	0.01 ⁿ	0.02 ⁿ	0.13	0.08	0.00	0.1
173L-181T	0.00	0.00	0.12	0.02 ⁿ	0.00	0.1
173L	0.05	0.03	0.06	0.01 ⁿ	0.00	0.0
184A	0.05	0.01 ⁿ	0.05	0.02 ⁿ	0.00	0.0
202G	0.00	0.02 ⁿ	0.01 ⁿ	0.04	0.00	0.0
NUMBER OF SEQUENCES	32724	35662	25289	19740	23249	

SD, standard deviation;

ⁿFrequencies below the mismatch error rate (0.03%); BC, Baseline combination (the master combination of positions where substitutions with the highest variation, shown in bold in Table 3, were located).Frequencies of combinations (linkage) of the 10 amino acid substitutions with the highest standard deviation of frequencies in the 5 sequential treatment samples from patient 4 (4A and 4B correspond to pre-treatment and 4C, 4D and 4E correspond to completion of lamivudine, adefovir, and entecavir, respectively). The variant combinations are presented in decreasing order (from most to least variable). Frequencies of combinations $\geq 1\%$ are shown in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0037874.t005

In the longitudinal study of the patient sequentially treated with LMV, ADV, and ETV monotherapies, the blind SD-based algorithm ranked the 7 NA resistance-related aa substitutions previously detected by routine analysis (rtL180M, rtM204V, rtS202G, rtV207I, rtA181T, rtV173L and rtI169T) as the most variable, and 5 additional NA resistance substitutions (rtV191I, rtM204I, rtT184A, rtA181S and rtA200V) immediately after

them. These findings confirm the utility of this methodology as a “scanning tool” to detect, without any previous assumptions, the most relevant substitutions associated with MDR, even some that would not be found unless specifically checked. The use of UDPS as a scanning tool linked to its ability to quantify the frequencies of HBV variants could provide a measure of their relative sensitivity to different NA therapies. In this sense, the rtA181T variant,

which strongly increased from pre-treatment to LMV and slightly decreased during ADV therapy, appeared to be more resistant to LMV than to ADV, in agreement with its previous phenotypic characterization [24]. With this approach, the sensitivity to different NAs of the less common resistant variants (rtV191I, rtA181S, and rtA200V) found among the most variable ones can also be studied. In this particular case, percentages of rtV191I increased during LMV and ADV, mainly in combination with the major variant rtA181T, suggesting a compensatory role of rtV191I to restore its replicative fitness. During ETV, percentages of both rtA181T and rtV191I dramatically decreased, indicating sensitivity to this drug. The variation in percentages of rtA181S followed a pattern similar to that of rtA181T, but with a less intense effect (moderately increased after LMV VBK, maintained during ADV, and undetectable after ETV treatment), therefore, position rt181 had a major role in resistance to multiple NAs in the longitudinally followed patient. Moreover, rtA181S is linked to the sW172C substitution in the minimal recognized sequence of the surface epitope TH-s156/s175 [27]; hence, it is likely to provide immune escape. In the case of the rtA200V substitution, although previously associated with resistance to LMV and LdT [32], in this longitudinal study it was only found significantly increased at ETV VBK, suggesting some “decreased sensitivity” to ETV. In the overlapping S ORF, quantitative UDPS analysis was applied to study the sensitivity of the HBV variants to immune pressure. In this sense, the increase in percentages of NA-resistant rtV191I in the absence of treatment concurs with its reported link to humoral immune response escape by an association with the surface stop codon sW182* [19], recently related to liver disease progression [43]. In addition, the sS167L variant, associated with a silent RT substitution in rtL175 (CTC to CTT), showed a continuous percentage increase in the absence of treatment and during follow-up. sS167 is located in the minimal recognized sequence of the TH-s156/s175 epitope, and changes in this residue have been reported in patients simultaneously showing HBsAg and anti-HBs antibodies [42]. Therefore, it would seem to be subjected to immune selection rather than treatment selection. Hence, the findings in the RT and S ORFs observed in the sequentially treated patient suggest that UDPS may have value as a “phenotype-like” assay to assess the influence of any type of selective pressure on the composition of viral quasispecies.

Quantitative UDPS analysis is not only useful to analyze particular positions of the HBV genome, but also to examine changes in the variability of the quasispecies by quantifying the global nt and aa divergences of its sequences in relation to the master sequence. In the longitudinally studied case, the high increase in nt divergence over several antiviral treatments reflects adaptation of the viral quasispecies by selection of antiviral-resistant variants. The higher divergence in nt sequences in comparison to aa sequences is likely related to genetic code degeneration. Furthermore, the higher aa divergence in S than in P ORFs observed when related to the master sequence of each sample may be evidence of immune pressure over envelope proteins, which are more prone to globally evolve than polymerase due to functional constrictions, especially in the absence of antiviral treatment. However, P and S divergences tended to equalize when they were analyzed in relation to the baseline master sequence (sample 4A). This pattern may reflect an evolutive pressure over P ORF positions affecting in parallel the corresponding overlapped S ORF positions.

The superiority of GS-FLX technology for clonally sequencing relatively long single DNA molecules as compared to other massive sequencing platforms [44] enabled study of particular combinations of two or more aa substitutions in the same genome

by linkage analysis. To facilitate computation and interpretation of these analyses, we focused on the 10 most variable substitutions, assuming that they would be the most relevant to study HBV adaptation to the pressure of sequential NA treatment. Using this approach, we found that in our MDR patient, with the single exception of rtA181T, all these substitutions were mainly found in combinations in all the samples studied. The substitution patterns were particularly complex at ETV VBK, with rtL180M-S202G-M204V-V207I being the main combination. This pattern was confirmed by molecular cloning, and had already been detected as a minor population at LMV VBK, followed by rt169T-173L-180M-204V and rt169T-173L-180M-202G-204V-207I (6 mutations in a single genome). In this particular case, the frequency of the LMV resistance signature (rtL180M-M204V) alone showed a considerable increase at ETV VBK relative to its frequency after LMV, as also occurred with the more complex variant rtV173L-L180M-M204V. This suggests that LMV-resistant mutants have slightly reduced sensitivity to ETV, as reported by phenotypic assays [22,45,46]. Unexpectedly, the rtV207I variant, which to date has only been associated with low sensitivity to LMV and resistance to famciclovir [20], was present in the most prevalent combined variants at ETV VBK (81% of sequences) and was also significantly increased at LMV VBK. This variant was mainly selected in combination with rtM204V, a fact that strongly suggests a compensatory role to restore the replicative efficiency of complex HBV variants carrying rtM204V, likely to compromise the success of ETV. Although these observations were obtained in a single case, this hypothesis is supported by our retrospective review of LiPA results. However, in contrast to this hypothesis, the sensitivity of the LMV-resistant signature to ETV did not change when the signature was combined with rtV207I in a previous phenotypic study [46]. Therefore, additional phenotypic analysis should be performed taking into account the complexity of the variants detected here by linkage analysis.

Our study has some limitations. Only a small number of serum samples could be analyzed because of the high cost of the technique and complexity of the computational analysis. Moreover, because only a single MDR patient was longitudinally analyzed, the results obtained regarding changes in the viral quasispecies under the effect of antiviral treatments require corroboration by further studies examining additional patients. In addition, due to the 250-bp-length limitation of the standard GS-FLX chemistry, the relevant NA-resistant substitutions, rtI233V and rtN236T linked to ADV treatment failure, and rtM250I/V linked to ETV failure [7], located outside the B and C HBV RT functional domains, were excluded from the fragment analyzed. However, this last limitation was not considered relevant because we only selected patients who did not show NA resistant substitutions outside the region analyzed, as assessed by LiPA and/or direct sequencing during follow-up.

To summarize, UDPS detected minor variants comprising less than 0.1% of the HBV viral quasispecies. Nonetheless, the information provided did not enable prediction of which resistant aa substitutions would be selected during treatment. Additional studies are needed to determine at what frequency HBV variants become clinically relevant. However, the high sensitivity of this technology has resulted in some unexpected findings: first, the high degree of conservation of residue rtL155 and a significant percentage of defective genomes at baseline (with variations in essential residues of the RT active site or stop codons in the S ORF) that became the predominant population after LMV and ADV treatments. These results suggest that the HBV quasispecies has an active trans-complementation mechanism enabled by coinfection of cells with multiple variants. Second, as tested in one

sequentially treated patient, assessing and ranking the variability of aa substitutions through sequential treatment using a “blinded” algorithmic method driven by an objective variability measure (SD) of their frequencies highlighted the most important substitutions occurring during this period, with no need for previous knowledge about HBV variants and their resistance to antiviral treatments. Therefore, this method can potentially act as a “scanning tool” to detect new resistant variants in viral quasispecies, and indicates a role as a “phenotype-like” method that provides information on the relative susceptibility of these variants to any type of selective pressure (eg, antiviral therapies or immune pressure). Quantitative UDPS analysis was also useful to analyze the global variability of the HBV quasispecies and its evolution, by quantifying the nt and aa divergences of its sequences. Lastly, the partial picture of reality provided by UDPS analysis of individual substitutions is significantly improved by linkage analysis, which allows detection and quantification of variant combinations, which seem to be the most common cause of resistance in anti-HBV therapy in our sequentially treated patient. In conclusion, UDPS offers significant advantages for the study of viral quasispecies, although currently its potential is mainly limited by its high cost. As new applications for this technology are developed, it is likely that the cost will significantly decrease.

Methods

Ethics statement

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Clinical Investigation of University Hospital Vall d'Hebron. Informed written consent from participating patients was obtained, according to the Declaration of Helsinki.

Patients and samples

Serum samples from 4 CHB patients were included in the study. To obtain comparable results, patients were selected according to the following criteria: first, all were hepatitis B e antigen (HBeAg)-positive and all had HBV genotype A, subgenotype A2, assessed by direct sequencing and alignment as previously reported [35]; second, they were initially treated with LMV and no resistance variants were found at baseline, as assessed by LiPA (INNO-LiPA HBV DR v2 assay, Innogenetics, Ghent, Belgium) or direct sequencing; and third, HBV NA-resistant variants outside the B and C domains of the RT were not selected in any case after NA treatment. The baseline characteristics and outcome of initial LMV treatment are summarized in Table 6. Patient 1 was only treated with LMV and showed virologic response (undetectable HBV-DNA levels by real-time PCR within 48 weeks of therapy [6]) and HBeAg seroconversion (loss of HBeAg with detection of anti-HBe antibodies) (Table 6). In contrast, patients 2, 3 and 4 experienced VBK with selection of resistant variants (Table 6). In patients 2 and 3, ADV was added after LMV VBK, and both showed virologic response with undetectable HBV-DNA levels after stopping LMV. In addition, patient 3 lost HBeAg after 3 years of ADV+LMV and additionally lost HBeAg in the following 3 years with ADV monotherapy. In patient 4, LMV failure was associated with emergence of the rtA181T variant (Figure 4). The patient, who was subsequently treated with ADV and ETV monotherapies, showed no response to ADV and had VBK after ETV with selection of resistant variants (Figure 4). TDF was then added to ETV, and the patient achieved virologic response without HBeAg loss up to the time this study was performed (Figure 4).

Eight serum samples were selected for UDPS analysis: 1 sample obtained before starting LMV therapy in patients 1, 2 and 3; and 5 consecutive samples from the sequentially treated patient 4, among which 2 samples (4A and 4B) were obtained before starting LMV in a 42-month period without treatment, and 1 sample each was obtained at the end of LMV (4C), ADV (4D) and ETV (4E) treatment (Figure 4).

HBV genome region analyzed by UDPS

To perform linkage analysis of the major NA-resistance-related aa substitutions in the RT region, a single fragment clustering these substitutions was analyzed. At selection of this fragment, the idea was to include the HBV RT B and C domains, which comprised all NA-resistant mutations previously detected by LiPA or direct sequencing at VBK in each patient (Table 6 and Figure 4) (third patient's inclusion criteria). In addition, to assess the changes in the most important epitopes of the overlapped S ORF, the fragment included the largest part possible of the C-terminal region of the immunodominant epitope “a determinant”, which had the main immunotherapy escape mutation sG145R, associated with the rtW153Q NA compensatory variant [18]. Finally, we had to restrict the length of the fragment to 250 bp as required by the standard GS-FLX technology, the only one available when the study was designed. These criteria were fulfilled by a fragment of 224 bp, in which 180 bp were analyzed after excluding the known sequences of the primers. The fragment selected covers an HBV P-S overlapping sequence spanning codons rt148 to rt208 in the P ORF and codons s140 to s200 in the S ORF (Figure 1). NA-resistance-related aa substitutions outside the B and C domains, such as rtI233V, rtN236T and rtM250I/V, were not considered relevant for the aims of the study, since they had not been detected during follow-up in any of the patients studied.

PCR amplification of the region analyzed

A 746-bp fragment (nt 246 to 992) of HBV-DNA including the region for UDPS analysis was amplified by PCR using primers F2 and R2 [47]. A second PCR run amplified the specific UDPS fragment (nt 551 to 775) with fusion primers HBVRTfw: 5'-*GCCTCCCTCGGCCCATCAGATGTTTCCCTCATGTTGCTG*-3' and HBVRTrv 5'-*GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGTACAGACTTGGCCCCCA*-3' (the 5' adaptor sequences that act as binding sites for the emulsion PCR and pyrosequencing reaction of the UDPS system, both ending with the TCAG barcode, are shown in italics). This second PCR run generated a 262-bp amplicon (Figure 1). To minimize misincorporation errors, the high-fidelity Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, Agilent Technologies, La Jolla, USA) was used in both PCR runs [13,48]. The length and quality of the amplicons obtained were verified by automated chip-based microcapillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer instrument, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and quantified (Quant-it PicoGreen dsDNA fluorescent Assay Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA). Ten μ L of each amplicon, with a concentration ≥ 0.5 ng/ μ L ($\geq 10^7$ copies/ μ L) underwent UDPS with the GS-FLX platform, according to the manufacturer's protocol.

The 746-bp amplicon obtained in the first PCR round from sample 4E was directly cloned, as previously described [49].

Quantification of artifactual errors

The main error source for the detection of single-base changes when deep-sequencing an amplicon seems to be polymerase mismatch errors [50]. To quantify these errors as has been done in previous studies [13,16], a DNA clone with a known sequence was UDPS-analyzed in triplicate and sequenced by the conventional

Table 6. Baseline characteristics of the patients included and outcome during LMV treatment.

BASELINE CHARACTERISTICS					LAMIVUDINE TREATMENT		
Patient	Age	Gender	HBV-DNA (log ₁₀ IU/mL)	ALT (IU/L)	Duration (months)	Type of Response	Resistant variants at VBK
1	70	F	6.54	112	28	HBeAg seroconversion and virologic response	None
2	52	M	6.08	53	51	Partial virologic response (2.2 log ^Δ) and VBK (7.7 log*)	rtM204V+rtL180M
3	54	M	7.08	73	39	Partial virologic response (4.2 log ^Δ) and VBK (7.3 log*)	rtM204V+rtL180M
4	32	M	8.44	39	19	Partial virologic response (2.6 log ^Δ) and VBK (7.2 log*)	rtM204V+rtL180M+rtA181T

F, female; M, male; HBeAg, hepatitis B e antigen; log, HBV-DNA (log₁₀IU/mL);
^Δ, HBV-DNA decrease 6 months after beginning lamivudine treatment relative to baseline;
 *, HBV-DNA levels at virologic breakthrough, which determined the end of lamivudine treatment and occurred at the end of the period indicated in the Duration column.
 HBV-DNA was quantified using real-time PCR (Cobas Ampliprep-Taqman, Roche; sensitivity 20 IU/mL), and resistant variants were determined in the sample obtained at viral breakthrough by LiPA (INNO-LiPA HBV DR v2 assay) and/or direct sequencing. The response to lamivudine treatment was defined as:
 - HBeAg seroconversion: Loss of hepatitis B e antigen with detection of anti-HBe antibodies.
 - Virologic response: undetectable HBV-DNA levels by real-time PCR within 48 weeks (12 months) of therapy [6].
 - Partial virologic response: decrease in HBV DNA of more than 1 log₁₀IU/mL, but detectable HBV DNA by real-time PCR, assessed at 24 weeks (6 months) of treatment, for lamivudine [6].
 - VBK: virologic breakthrough - increase in serum HBV-DNA levels of at least 1 log₁₀IU/mL compared to the lowest value during NA treatment, confirmed by real-time PCR [6].
 doi:10.1371/journal.pone.0037874.t006

Sanger method. Any differences between UDPS reads and the Sanger sequence were considered UDPS errors. In addition, UDPS has been reported to be more error prone in homopolymeric regions (3 or more identical consecutive nts flanked by non-identical bases) [12]. For this reason, different arrays of mismatch frequencies (μ values) were generated in homopolymeric and non-homopolymeric regions (Table 7).

Computational analysis

Data accuracy of the UDPS reads was initially validated as recently reported [34]. However, to exclude reads with low-confidence single-base changes, we approximated the distribution of mismatch errors using Poisson distribution [13] instead of an internal control sequence [34] (details in Table 7). Variants with a low probability of being erroneous (P<0.05) were included in the analysis.

Table 7. Poisson model for quantification of artifactual errors.

Homopolymeric (r = 1)	A	C	T	G
A	1	2.34 × 10 ⁻⁶	2.04 × 10 ⁻⁶	3.49 × 10 ⁻⁶
C	4.98 × 10 ⁻⁶	1	3.56 × 10 ⁻⁵	1.95 × 10 ⁻⁵
T	3.99 × 10 ⁻⁶	2.91 × 10 ⁻⁶	1	2.04 × 10 ⁻⁶
G	1.50 × 10 ⁻⁴	3.92 × 10 ⁻⁵	4.40 × 10 ⁻⁶	1
Non-homopolymeric (r = 2)	A	C	T	G
A	1	2.93 × 10 ⁻⁶	1.47 × 10 ⁻⁶	7.53 × 10 ⁻⁶
C	4.83 × 10 ⁻⁶	1	1.01 × 10 ⁻⁵	3.20 × 10 ⁻⁶
T	1.21 × 10 ⁻⁶	7.39 × 10 ⁻⁶	1	1.77 × 10 ⁻⁵
G	4.23 × 10 ⁻⁵	1.41 × 10 ⁻⁶	2.91 × 10 ⁻⁶	1

The nucleotide (nt) expected to be found at a given position is expressed as nt_sⁱ, "s" indicates sequence position (s = 1 to 180) and "i" indicates nt of the master sequence found in "s" position (1 = A, 2 = C, 3 = T, 4 = G). An observed variant "s" is represented as nt_s^j, where "j" indicates the nt substitution (1 = A, 2 = C, 3 = T, 4 = G); k_s^j represents the number of occurrences of an "i" to "j" substitution (nt_sⁱ to nt_s^j) in the N reads covering an "s". The distribution of mismatch errors was approximated using Poisson distribution, extended to make the parameters depend on the type of mismatch error (12 possible substitutions [A:C, A:T, A:G, C:A, C:T, C:G, T:A, T:C, T:G, G:A, G:C, G:T]) and the region type (homopolymeric/non-homopolymeric). Thus, assuming k_s^j as a Poisson-distributed random variable, the P-value associated with this test was calculated as:

$$p = 1 - \sum_{l=0}^{k_s^j - 1} \frac{e^{-\lambda} \lambda^l}{l!}$$

In which λ is the expected number of errors nt_sⁱ to nt_s^j at "s" site: λ = μ_{ij} × N with r referring to the type of region (r = 1 for homopolymeric and r = 2 for non-homopolymeric), with μ_{ij} values from the array of mismatch frequencies shown in the table. For example, if a T to A change (i = 3 and j = 1) at a certain site in a non-homopolymeric region, (r = 2), then μ₃₁₂ = 1.21 × 10⁻⁶ and λ = μ₃₁₂ × N = 1.21 × 10⁻⁶ × N. In a type of filter strategy, after applying the Poisson formula, variants with a low probability of being erroneous (P<0.05) were included in the analysis.
 doi:10.1371/journal.pone.0037874.t007



Longitudinal variability of the HBV quasispecies in the sequentially analyzed MDR patient was assessed by a “blind” algorithm-driven method, which consists of ranking each aa substitution according to the standard deviation (SD) of its frequencies in the validated reads from each of the 5 samples from patient 4, assuming that the substitution with the highest SD value through the 5 consecutive samples would be the most variable.

Validation of UDPS data

The Poisson-based statistical filter was validated using an independent HBV RT clone, processed as the patient samples. The empirical distribution of mismatch errors in the clone yielded an average of 0.007%, but in 4 positions, errors were higher than 0.02% and lower than 0.03%. Therefore, the sensitivity of UDPS to detect mutations was limited by a mismatch error rate of 0.03%, a value similar to the rate reported using a restriction target sequence as internal control [34]. Nonetheless, to focus the analysis on the most significant changes, the quantifications and biological conclusions reported here are based on mutations comprising $\geq 0.1\%$ of the viral population.

Statistical analysis

The frequencies of aa substitutions known to be associated with resistance to NA treatment were compared to the remaining aa changes in the baseline viral populations using the Mann-Whitney *U* test with significance set at a *P*-value of < 0.05 . The analysis was performed with SPSS, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Acceptance of a nucleotide substitution was decided by Poisson distribution modeling (details in Table 7).

Supporting Information

Figure S1 Three-dimensional representation of the homology model of the HBV polymerase. The representation of HBV polymerase (yellow) is based on the crystal structure of the catalytic center of the HIV polymerase (black wire) [1], with tenofovir (orange) blocking the active site (YMDD) in blue; in dark grey, the DNA-RNA growing duplex. The most important positions associated with antiviral resistance are identified

References

1. Beck J, Nassal M (2007) Hepatitis B virus replication. *World journal of gastroenterology* 13: 48–64.
2. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehmet R, Thomas HC, et al. (1996) Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 4398–4402.
3. Osiowy C, Giles E, Tanaka Y, Mizokami M, Mimuk GY (2006) Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *Journal of virology* 80: 10307–10314. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1641782&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 2011 Jun 27.
4. Kay A, Zoulim F (2007) Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus research* 127: 164–176. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17383765>. Accessed 2011 Jun 27.
5. Domingo E, Holland JJ (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology* 51: 151–178. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343347>. Accessed 2012 May 9.
6. European Association For The Study Of The Liver (2009) EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *Journal of hepatology* 50: 227–242. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054588>. Accessed 2012 May 9.
7. Zoulim F, Locarnini SA (2009) Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 137: 1593–1608. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737565>. Accessed 2011 Jan 26.
8. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini SA, Wursthorn K, Petersen J, et al. (2004) Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 126: 1750–1758. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508504004482>. Accessed 2011 May 6 May.

(rtL180, rtS202, rtM204, and rtV207 in black), as well as the most conserved position detected in our study (rtL155), which is located outside the active site, at the surface of the structure. (Tuske S, Sarafianos SG, Clark AD, Ding J, Naeger LK, et al. (2004) Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nature structural & molecular biology* 11: 469–474. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15107837>. Accessed 2011 Oct 10.) (PPT)

Table S1 Frequencies of all amino acid substitutions found in the four baseline populations (1 to 4). (DOC)

Table S2 Comparison of percentage of amino acid changes in the reverse transcriptase and surface coding regions over the four pre-treatment samples. (DOC)

Dataset S1 Alignment of master nucleotide sequences of the 8 samples analyzed. (FAS)

Dataset S2 Alignment of master nucleotide sequences of the 8 samples analyzed, translated into amino acids in P open reading frame. (FAS)

Dataset S3 Alignment of master nucleotide sequences of the 8 samples analyzed, translated into amino acids in S open reading frame. In samples 4C and 4D, the S protein amino acid sequence is truncated at position s172 by the presence of a stop codon, as a result of polymerase substitution rtA181T. (FAS)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FR JQ JIE ED RJ JG RE MB. Performed the experiments: DT MC SC MS MH DG. Analyzed the data: FR DT JQ IO AS CF. Wrote the paper: FR DT JQ JIE IO MB. Obtained funding: FR JQ RE MB. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: ED MC SC AS CF RJ MS MH DG JG RE. Study Supervision: RJ JG RE MB.

- antiretroviral treatment-naïve patients significantly impact treatment outcomes. *The Journal of infectious diseases* 199: 693–701. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210162>. Accessed 2011 May 16.
16. Solomone M, Vincenti D, Prosperi MCF, Bruselles A, Ippolito G, et al. (2009) Use of massively parallel ultra-deep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naïve patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *Journal of virology* 83: 1718–1726. Available: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/83/4/1718>. Accessed 2011 Jun 13.
 17. Margeridon-Thermet S, Shulman NS, Ahmed A, Shahriar R, Liu TF, et al. (2009) Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naïve patients. *The Journal of infectious diseases* 199: 1275–1285. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19301976>. Accessed 2010 Jun 30.
 18. Torresi J, Earnest-Silveira L, Civitico G, Walters TE, Locarnini SA, et al. (2002) Restoration of Replication Phenotype of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Mutants by Compensatory Changes in the “Fingers” Subdomain of the Viral Polymerase Selected as a Consequence of Mutations in the Overlapping S Gene. *Virology* 299: 88–99. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682202914480>. Accessed 2011 Jul 19.
 19. Amini-Bavil-Olyaei S, Sheldon J, Lutz T, Trautwein C, Tacke F (2009) Molecular analysis of an HBsAg-negative hepatitis B virus mutant selected in a tenofovir-treated HIV-hepatitis B virus co-infected patient. *AIDS* 23: 268–272. Available: http://journals.lww.com/aidsonline/Abstract/2009/01140/Molecular_analysis_of_an_HBsAg_negative_hepatitis_B_virus_mutant_selected_in_a_tenofovir-treated_HIV-hepatitis_B_virus_co-infected_patient.aspx. Accessed 2011 Jun 13.
 20. Xiong X, Yang H, Westland C, Zou R, Gibbs CS (2000) In vitro evaluation of hepatitis B virus polymerase mutations associated with famciclovir resistance. *Hepatology* (Baltimore, Md) 31: 219–224. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10613749>.
 21. Reijnders JGP, Deterding K, Petersen J, Zoulim F, Santantonio T, et al. (2010) Antiviral effect of entecavir in chronic hepatitis B: influence of prior exposure to nucleos(t)ide analogues. *Journal of hepatology* 52: 493–500. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20185191>. Accessed 2011 Jun 13.
 22. Tenney D, Levine S, Rose R, Walsh A, Weinheimer S, et al. (2004) Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 3498–3507. Available: <http://aac.asm.org/cgi/content/abstract/48/9/3498>. Accessed 2011 Jun 24.
 23. Warner N, Locarnini SA (2008) The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. *Hepatology* (Baltimore, Md) 48: 88–98. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537180>. Accessed 2011 Jun 24.
 24. Villet S, Pichoud C, Billoud G, Barraud L, Durantel S, et al. (2008) Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *Journal of hepatology* 48: 747–755. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18331765>. Accessed 2011 Jun 13.
 25. Torresi J, Earnest-Silveira L, Delyannis G, Edgton K, Zhuang H, et al. (2002) Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 293: 305–313. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11886250>. Accessed 2011 Aug 26.
 26. Carman W, Karayiannis P, Waters J, Thomas HC, Zanetti AR, et al. (1990) Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *The Lancet* 336: 325–329. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697396>. Accessed 2011 Aug 9.
 27. Honorati MC, Dolzani P, Mariani E, Piacentini A, Lisignoli G, et al. (1997) Epitope specificity of Th0/Th2 CD4+ T-lymphocyte clones induced by vaccination with rHBsAg vaccine. *Gastroenterology* 112: 2017–2027. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178695>.
 28. Das K, Xiong X, Yang H, Westland C, Gibbs CS, et al. (2001) Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and entecavir (FTC). *Journal of virology* 75: 4771–4779. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=114232&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 2011 Aug 9.
 29. Salisse J, Sureau C (2009) A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus “a” determinant. *Journal of virology* 83: 9321–9328. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2738268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 2011 Jun 13.
 30. van Hemert FJ, Zaaier HL, Berkhout B, Lukashov VV (2008) Mosaic amino acid conservation in 3D-structures of surface protein and polymerase of hepatitis B virus. *Virology* 370: 362–372. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17935747>. Accessed 2011 Jun 27.
 31. Abou-Jaoudé G, Sureau C (2007) Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange. *Journal of virology* 81: 13057–13066. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2169099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 2011 Aug 22.
 32. Rhee S-Y, Margeridon-Thermet S, Liu TF, Nguyen MH, Kagan RM, et al. (2010) Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase Sequence Variant Database For Sequence Analysis And Mutation Discovery. *Antiviral research* 88: 269–275. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20875460>. Accessed 2010 Oct 1.
 33. Lok ASF, Zoulim F, Locarnini SA, Mangia A, Niro G, et al. (2002) Monitoring Drug Resistance in Chronic Hepatitis B Virus (HBV)-Infected Patients during Lamivudine Therapy: Evaluation of Performance of INNO-LiPA HBV DR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 3729–3734. Available: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.40.10.3729-3734.2002>.
 34. Homs M, Buti M, Quer J, Jardi R, Schaper M, et al. (2011) Ultra-deep pyrosequencing analysis of the hepatitis B virus preCore region and main catalytic motif of the viral polymerase in the same viral genome. *Nucleic Acids Research* 39: 8457–8471. Available: <http://www.nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gkr451>. Accessed 2011 Jul 11.
 35. Rodriguez-Frias F, Jardi R, Schaper M, Buti M, Ferrer-Costa C, et al. (2008) Adefovir for chronic hepatitis B treatment: identification of virological markers linked to therapy response. *Antiviral therapy* 13: 991–999. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19195324>. Accessed 2011 Mar 13.
 36. Langley DR, Walsh A, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose R, et al. (2007) Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *Journal of virology* 81: 3992–4001. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866160&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 2011 Jun 29.
 37. Radziwill G, Tucker W, Schaller H (1990) Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *Journal of virology* 64: 613–620. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=249151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 38. Lanford RE, Notvall L, Lee H, Beames B (1997) Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase. *Journal of virology* 71: 2996–3004. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=191428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 39. Urban M, McMillan DJ, Canning G, Newell A, Brown E, et al. (1998) In vitro activity of hepatitis B virus polymerase: requirement for distinct metal ions and the viral epsilon stem-loop. *The Journal of general virology* 79: 1121–1131. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603327>.
 40. Ganem D, Prince AM (2004) Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine* 350: 1118–1129. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15014185>.
 41. Huang L-M, Lu C-Y, Chen D-S (2011) Hepatitis B virus infection, its sequelae, and prevention by vaccination. *Current opinion in immunology* 23: 237–243. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257300>. Accessed 2011 Sep 11.
 42. Lada O, Benhamou Y, Poyard T, Thibault V (2006) Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of “a” determinant variants. *Journal of virology* 80: 2968–2975. Available: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/80/6/2968>. Accessed 2011 Jun 13.
 43. Lee S-A, Kim K-J, Kim H, Kim B-J (2012) Nucleotide change of codon 182 in the surface gene of hepatitis B virus genotype C leading to truncated surface protein is associated with progression of liver diseases. *Journal of hepatology* 56: 63–69. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827734>. Accessed 2011 Aug 16.
 44. Zhao J, Grant SFA (2011) Advances in Whole Genome Sequencing Technology. *Current pharmaceutical biotechnology* 12: 293–305. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050163>. Accessed 2011 Aug 28.
 45. Villet S, Ollivet A, Pichoud C, Barraud L, Villeneuve J-P, et al. (2007) Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient. *Journal of hepatology* 46: 531–538. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239478>. Accessed 2011 Aug 21.
 46. Levine S, Hernandez D, Yamanaka G, Zhang S, Rose R, et al. (2002) Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46: 2525–2532. Available: <http://aac.asm.org/cgi/content/abstract/46/8/2525>. Accessed 2011 Jul 4.
 47. Jardi R, Rodriguez-Frias F, Schaper M, Ruiz G, Elefsinioti I, et al. (2007) Hepatitis B virus polymerase variants associated with entecavir drug resistance in treatment-naïve patients. *Journal of viral hepatitis* 14: 835–840. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070286>. Accessed 2011 Jul 19.
 48. Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome biology* 8: R143. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 2011 May 12.
 49. Jardi R, Rodriguez-Frias F, Schaper M, Giggi E, Taberno D, et al. (2008) Analysis of hepatitis B genotype changes in chronic hepatitis B infection: Influence of antiviral therapy. *Journal of Hepatology* 49: 695–701. doi:10.1016/j.jhep.2008.03.030.
 50. Campbell PJ, Peasance ED, Stephens PJ, Dicks E, Rance R, et al. (2008) Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 13081–13086. Available: <http://www.pnas.org/content/105/35/13081.short>. Accessed 2011 Jun 13.

Hepatitis B virus quasispecies evolution after liver transplantation in patients under long-term lamivudine prophylaxis with or without hepatitis B immune globulin

M. Buti, D. Tabernero, A. Mas, M. Homs, M. Prieto, F. Rodríguez-Frías, F. Casafont, R. Casillas, A. González, M. Miras, J.I. Herrero, L. Castells, R. Esteban. Hepatitis B virus quasispecies evolution after liver transplantation in patients under long-term lamivudine prophylaxis with or without hepatitis B immune globulin. *Transpl Infect Dis* 2015; **17**: 208–220. All rights reserved

Abstract: *Aims.* To investigate an optimal long-term prophylactic strategy for prevention of hepatitis B virus (HBV) recurrence after liver transplantation, we conducted a randomized study of 29 transplant recipients receiving a short course of hepatitis B immune globulin (HBIG) + lamivudine (LAM), followed by randomization to long-term prophylaxis with LAM with or without HBIG.

Methods. The efficacy and safety, and impact on survival and HBV recurrence of these 2 prophylactic regimens were compared over a mean period of 10 years. In patients with viral recurrence, the HBV quasispecies in the surface/polymerase region were studied by ultra-deep pyrosequencing (UDPS).

Results. The 10-year survival rate was 76% and was not affected by the type of prophylaxis. Four patients had hepatitis B surface antigen (HBsAg) recurrence within the first 48 months after orthotopic liver transplantation (OLT). HBsAg-positive and -negative patients showed similar mean survival times, with no differences between the 2 regimens. Low HBV DNA levels were transiently detected in 32% of HBsAg-negative patients. UDPS showed major changes after OLT in the HBV quasispecies of patients with viral recurrence, which may be explained by a “bottleneck” effect of OLT together with prophylactic therapy.

Conclusion. Long-term survival after OLT in end-stage chronic hepatitis B patients was good with both prophylactic strategies. However, low, transient HBV DNA levels were detected even in the absence of HBsAg, showing the importance of continuing HBV prophylaxis.

M. Buti^{1,2}, D. Tabernero^{1,3}, A. Mas^{1,4}, M. Homs^{1,3}, M. Prieto^{1,5}, F. Rodríguez-Frías^{1,3}, F. Casafont⁶, R. Casillas², A. González⁷, M. Miras^{1,8}, J.I. Herrero^{1,9}, L. Castells^{1,2}, R. Esteban^{1,2}

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ²Liver Unit, Hospital Universitari Vall d’Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain, ³Liver Pathology Unit, Departments of Biochemistry and Microbiology, Hospital Universitari Vall d’Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain, ⁴Liver Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain, ⁵Hepatology Unit, Digestive Medicine Service, Hospital Universitari Politècnic La Fe, Valencia, Spain, ⁶Gastroenterology and Hepatology Unit, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria, Santander, Spain, ⁷Digestive Medicine Service, Hospital Nuestra Señora de la Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain, ⁸Digestive Medicine Service, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain, ⁹Liver Unit, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

Key words: orthotopic liver transplantation; chronic hepatitis B; HBV DNA; HBV quasispecies; hepatitis B surface antigen (HBsAg); ultra-deep pyrosequencing (UDPS)

Correspondence to:
Maria Buti, MD, PhD, Liver Unit,
Hospital Universitari Vall d’Hebron,
Passeig Vall d’Hebron 119-129,
08035 Barcelona, Spain
Tel: +34 93 2746559
Fax: +34 93 4274495
E-mail: mbuti@vhebron.net

Received 11 September 2014, revised 23 December 2014, accepted for publication 18 January 2015

DOI: 10.1111/tid.12360
Transpl Infect Dis 2015; **17**: 208–220

Surface/polymerase hepatitis B virus (HBV) variants found by ultra-deep pyrosequencing in the patient with hepatitis B surface antigen (HBsAg)-positive recurrence in proportions above 1% of the quasispecies

Sample (months from collection to OLT)	Antiviral treatment	HBV DNA, IU/mL	Surface variants inside the "a" determinant (24, 25)		Surface variants outside the "a" determinant (26-29)		Reverse transcriptase variants related to NUC resistance (20, 30, 31)		
			Frequency <20%	Frequency ≥20%	Frequency <20%	Frequency ≥20%	Frequency <20%	Frequency ≥20%	
A (2 Pre-OLT)	LAM	3.2 × 10 ⁴	sT126I (3.4)	–	sV106G (2.8)	sW172* (54.0) ^{‡#}	rtT128N (18.9)	rtV191I (54.3)	
			sG130R (4.7) [■]	–	sS117N (2.0)	sW182* (54.3) ^{‡#}			
			sT131I (1.4) [▲]	–	sP120T (18.9) [▲]	sV184A (99.4)			
			sY134D (14.2)	–	sL173P (1.2)	sP188L (52.7)			
			sD144E (3.9) [■]	–					
B (26 Post-OLT)	LAM + ADV	3.7 × 10 ⁶	–	–	sL175F (2.6)	sP120T (100) [▲]	rtT184S (2.6)	rtT128N (100)	
					sW196L (1.0)	sE164D (95.4) [▲]	rtM204I (1.0)	rtV173L (95.4)	
C (36 Post-OLT)	LAM + ADV	7.3 × 10 ³	–	–	–	sV184A (100)		rtL180M (99.3)	
						sI195M (99.0) [▲]		rtM204V (99.0)	
						–	sL175F (4.4)	rtT184S (4.4)	rtT128N (100)
						–	–	rtV173L (95.4)	rtL180M (100)
						–	–	sV184A (100)	rtM204V (100)

This patient received hepatitis B immune globulin (HBIG) + lamivudine (LAM) for 18 months after liver transplantation. Variants are grouped according to their location in surface proteins or their relation with NUC resistance and according to whether they could have been detected by conventional (Sanger) sequencing or not (detection limit = 20% of the quasispecies).

▲ Variants related to reduced binding to anti-HBs/ HBIG antibodies or vaccine escape.

■ Variants related to decreased HBsAg detection.

*STOP codon.

‡ Variants related to reduced HBsAg secretion.

Variants related to reduced virion secretion.

NUCs, nucleoside/nucleotide analogs; OLT, orthotopic liver transplantation; ADV, adefovir.

Table 2

Surface/polymerase hepatitis B virus (HBV) variants found by ultra-deep pyrosequencing in the 3 patients with hepatitis B surface antigen (HBsAg)-negative recurrence in proportions above 1% of quasispecies

Patient	Sample (months from collection to OLT)	Antiviral treatment	HBV DNA (IU/mL)	Surface variants inside the "a" determinant (24, 29, 32)		Surface variants outside the "a" determinant (24, 26, 27, 29, 33)		Reverse transcriptase variants related to NUCs resistance (20, 30)		
				Frequency <20%	Frequency ≥20%	Frequency <20%	Frequency ≥20%	Frequency <20%	Frequency ≥20%	
1	D (3 Pre-OLT) E (27 Post-OLT)	LAM HBVig + LAM	1.8 × 10 ⁵ 2.7 × 10 ³	sY134H (1.6)▲■	-	sW182* (1.3)†# sQ101K (3.8)■ sG112* (1.6) sS155P (1.3)■ sI195M (3.8)▲	sT189I (99.1)	-	-	
										2
3	G (12 Post-OLT) H (4 Pre-OLT)	HBVig + LAM LAM	5.1 × 10 ³ 6.5 × 10 ⁵	-	sT126S (9.1)†#■ sQ129R (5.3)†#	sG130N (58.6)▲■	sI92T (7.7) sL94S (7.7) sQ101K (19.4)■ sQ101H (1.4) sL104F (2.0) sL109V (2.0) sI110V (13.4) sF170S (7.0) sW172* (1.3)†#	sV177A (87.6)	rtA181T (1.3)	
										I (21 Post-OLT) J (58 Post-OLT)

Patient 3 received hepatitis B immune globulin (HBIG) + lamivudine (LAM) for 1 month after liver transplantation. Variants are grouped according to their location in surface proteins or their relation with NUC resistance and according to whether they could have been detected by conventional (Sanger) sequencing or not (detection limit = 20% of the quasispecies). Variants related to ▲Reduced binding to anti-HBs/ HBIG antibodies or vaccine escape.
■Decreased HBsAg detection.
* STOP codon.
†Reduced HBsAg secretion.
#Reduced virion secretion.
NUCs, nucleoside/nucleotide analogs; OLT, orthotopic liver transplantation.

Table 3



Analysis of hepatitis B genotype changes in chronic hepatitis B infection: Influence of antiviral therapy[☆]

Rosendo Jordi^{1,3,*}, Francisco Rodriguez-Frias^{1,3}, Melanie Schaper^{1,3}, Elena Giggi², David Tabernero³, Maria Homs², Rafael Esteban^{2,3}, Maria Buti^{2,3}

¹Department of Biochemistry, Hospital General Universitario Vall d'Hebrón, Paseo Valle Hebrón s/n, Servicio de Bioquímica, Barcelona 08035, Spain

²Department of Hepatology, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Spain

Background/Aims: The frequency of mixed hepatitis B virus (HBV) genotypes in chronic HBV (CHB) and genotype changes during natural disease evolution and as a result of antiviral therapy were investigated.

Methods: Serum samples from 103 CHB patients were included in a cross-sectional study. Longitudinal study of HBV genotypes was performed in 22 patients, 17 of them under antiviral therapy (lamivudine and/or adefovir). HBV genotyping was done by the INNO-LiPA HBV assay.

Results: Genotypes observed in the cross-sectional study: A 32% of cases, D 42%, C 2%, F 2%, and mixed genotypes 22% (mainly A/D, followed by A/G). Genotype G was found in 7% of patients, always combined with other genotypes. In the longitudinal study, genotype changes were observed only in treated patients (9 cases). Genotype A strains were positively selected in 6 of them, mainly as mixed A/D. In 6 patients, selection coincided with a decrease in HBV-DNA levels.

Conclusions: A high frequency of mixed HBV genotypes was observed in our setting. Selection of genotype A strains during treatment is likely an indication that sensitivity to therapy differs between genotypes A and D. The absence of changes in untreated patients suggests that HBV genotype is stable without external factors.

© 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Hepatitis B virus; HBV genotypes; Genotype co-infection; Genotype switches; Chronic hepatitis B; Antiviral treatment

Original article

Adefovir for chronic hepatitis B treatment: identification of virological markers linked to therapy response

Francisco Rodriguez-Frias^{1,2*}, Rosendo Jordi^{1,2}, Melanie Schaper^{1,2}, Maria Buti^{2,3}, Carles Ferrer-Costa⁴, David Tabernero², Maria Homs² and Rafael Esteban^{2,3}

¹Department of Biochemistry, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain

³Department of Hepatology, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁴Molecular Modelling and Bioinformatics Unit, Institut de Recerca Biomèdica, Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain

*Corresponding author: E-mail: frarodri@vhebron.net

Background: HBV variants rtA181V/T, rtN236T and rtI233V, which confer resistance to adefovir dipivoxil (ADV), are not detected in many non-responding patients. Virological characteristics useful for predicting response have not been clearly elucidated. We determined pretreatment virological markers to predict non-response and possible emergence of new variants during therapy. **Methods:** This longitudinal study included 41 patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection receiving ADV monotherapy or ADV plus lamivudine (3TC). A fragment of HBV polymerase including catalytic domains was analysed for ADV-resistant variants.

Results: Complete virological response (CVR; HBV DNA < 2.5 log₁₀ copies/ml) was observed in 15 (36.6%) patients and partial virological response (PVR; HBV DNA < 4 log₁₀ copies/ml) in 23 (56.1%) patients. On multivariate analyses, hepatitis B e antigen (HBeAg) status was independently associated with CVR (hazard ratio

[HR]=0.27, *P*=0.002) and PVR (HR=0.21, *P*<0.001) and viral genotype with CVR (HR=0.13, *P*=0.01). Predictive values for HBeAg were 88% for PVR in HBeAg-negative and 79% for non-CVR in HBeAg-positive patients. Predictive values for viral genotype were 93% for non-CVR and 72% for non-PVR for genotype A. On sequencing, variant rt217R (associated with subgenotype A2) was predictive of non-CVR (100%) and non-PVR (72.7%); the rtS219A variant emerged during therapy in three non-PVR patients. Both positions are located in a region likely to be related to the substrate union site, as predicted by our structural model of the HBV polymerase.

Conclusions: Virological pretreatment characteristics (HBeAg, viral genotype and rtL217R polymorphism) are potentially associated with ADV response. HBV polymerase structural modelling has provided a hypothesis to explain the molecular mechanism for ADV resistance associated with rtR217.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2009, p. 485-488

0095-1137/09/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.01678-08

Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 47, No. 2

Use of the Novel INNO-LiPA Line Probe Assay for Detection of Hepatitis B Virus Variants That Confer Resistance to Entecavir Therapy[▽]

Rosendo Jordi,^{1,3*} Francisco Rodriguez-Frias,^{1,3} David Tabernero,³ Maria Homs,³ Melanie Schaper,¹ Rafael Esteban,^{2,3} and Maria Buti^{2,3}

Departments of Biochemistry¹ and Hepatology,² Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain³

Received 29 August 2008/Returned for modification 8 October 2008/Accepted 22 November 2008

A line probe assay (INNO-LiPA DR, version 3) for the detection of hepatitis B virus mutations that confer resistance to entecavir therapy was evaluated. The INNO-LiPA DR assay is a highly sensitive assay that is easily applicable for the detection and monitoring of entecavir resistance-conferring mutations and is more sensitive than sequencing for the detection of mixed sequences.

Main mutations in the hepatitis B virus basic core promoter (A1762T/G1764A) before HBeAg loss are markers that identify patients who will require long-term treatment

D. Tabernero^{1,*,‡}, M. J. Sánchez^{1,†}, M. Homs^{*,‡}, F. Rodríguez-Frías^{*,‡}, R. Jardí^{*,‡}, M. Schaper^{*,‡}, R. Esteban^{*,†} & M. Buti^{*,†}

^{*}Centro de Investigación Biomédica en Red de enfermedades hepáticas y digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain.

[†]Liver unit, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

[‡]Biochemistry unit, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Correspondence to:

Dr M. Buti, Department of Hepatology, Hospital General Vall d'Hebrón, Paseo Valle Hebrón s/n Barcelona 08035, Spain.
E-mail: mbuti@vhebron.net

[†]D. Tabernero and M. J. Sánchez were equal contributors.

Publication data

Submitted 26 January 2010
First decision 9 February 2010
Resubmitted 4 March 2010
Accepted 26 March 2010
Epub Accepted Article 31 March 2010

SUMMARY

Background

Some patients continue to have detectable HBV-DNA levels with liver disease progression after hepatitis B e antigen (HBeAg) loss. It is important to identify these patients, candidates for long-term treatment.

Aims

To evaluate hepatitis B virus (HBV) genotype and the main mutations in the basic core promoter (BCP, A1762T/G1764A) and precore (G1896A) sequences as markers of persistent HBV-DNA after HBeAg loss.

Methods

We analysed 60 serum samples from 20 Caucasian, HBeAg-positive, chronic hepatitis B patients, who lost HBeAg and were followed-up longitudinally. HBV genotype and precore and BCP mutations were determined before, at the time of, and after HBeAg loss.

Results

After HBeAg loss, eight (40%) patients continued to have undetectable HBV-DNA and 12 (60%) had persistent HBV-DNA (median level 4.7 log₁₀ copies/mL). The presence of BCP mutations prior to therapy was the only variable associated with persistently detectable viraemia ($P = 0.017$). Four patients with genotype A and no mutations in the BCP region experienced hepatitis B surface antigen (HBsAg) loss after a mean period of 35 months from baseline.

Conclusions

Main BCP mutations in HBeAg-positive patients are useful markers to identify patients who will not have sustained virological suppression after HBeAg loss and therapy discontinuation and could benefit from long-term treatment.

Aliment Pharmacol Ther 2010; 32: 97-104

Original article

HBV core region variability: effect of antiviral treatments on main epitopic regions

Maria Homs^{1,2}, Rosendo Jordi^{1,2}, Maria Buti^{1,3}, Melanie Schaper^{1,2}, David Tabernero^{1,2}, Pilar Fernandez-Fernandez², Josep Quer^{1,3}, Rafael Esteban^{1,3}, Francisco Rodriguez-Frias^{1,2*}

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto Carlos III, Madrid, Spain

²Department of Biochemistry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³Department of Hepatology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

*Corresponding author e-mail: frarodri@vhebron.net

Background: Amino acid (AA) changes in specific hepatitis B core antigen (HBcAg) regions were assessed in patients infected with chronic hepatitis B (CHB) after a 12-month untreated period and after receiving antiviral therapy (interferon, lamivudine or adefovir dipivoxil), and in inactive hepatitis B surface antigen-positive carriers.

Methods: Samples corresponding to different time points in 76 CHB cases (64 on-treatment) and 4 inactive carriers were included. The main precore mutation, T-helper immunodominant epitope at AA 50–69 (Th50–69), minor T-helper epitope (Th28–47), B-cell immunodominant epitope (B74–84) and a conserved region of HBcAg at AA 1–11 (AA1–11) were directly sequenced. For comparisons, the average number of AA changes in each region was standardized to 12 months (Av12).

Results: AA changes clustered mainly in immunodominant regions (69%). The highest percentage of cases (%n) with changes and highest Av12 changes were detected

after interferon treatment (%n=73%, Av12=3.1 in Th50–69 and %n=86%, Av12=2.7 in B74–84). At baseline, immunodominant regions had higher Av12 changes in hepatitis B e antigen-negative patients and those with main precore mutations. Changes in the Th28–47 region were more frequent after nucleoside/nucleotide analogue treatment (40%) than before treatment (9%). Codons 74 and 77 were the most polymorphic, and the double change E64D–N67T was significantly observed. Codon 84 substitutions were mainly associated with interferon treatment ($P=0.05$).

Conclusions: Natural and treatment-induced substitutions in HBV core protein, occurring especially with interferon treatment, were characterized. Some immunostimulating activity related to the minor Th28–47 epitope might be associated with nucleoside/nucleotide analogues; this activity was also seen in inactive carriers.

Ultra-deep pyrosequencing analysis of the hepatitis B virus preCore region and main catalytic motif of the viral polymerase in the same viral genome

Maria Homs^{1,2}, Maria Buti^{1,3}, Josep Quer¹, Rosendo Jardí^{1,2}, Melanie Schaper^{1,2}, David Tabernero^{1,2}, Israel Ortega⁴, Alex Sanchez⁴, Rafael Esteban^{1,3} and Francisco Rodriguez-Frias^{1,2,*}

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto Carlos III Corsega 180, 08036, Barcelona, ²Department of Biochemistry, ³Department of Hepatology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035, Barcelona and ⁴Statistics and Bioinformatics Unit, Research Institut, Hospital Vall d'Hebron Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035, Barcelona, Spain

Received March 16, 2011; Revised April 27, 2011; Accepted May 16, 2011

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) pregenomic RNA contains a hairpin structure (ϵ) located in the preCore region, essential for viral replication. ϵ stability is enhanced by the presence of preCore variants and ϵ is recognized by the HBV polymerase (Pol). Mutations in the retrotranscriptase domain (YMDD) of Pol are associated with treatment resistance. The aim of this study was to analyze the preCore region and YMDD motif by ultra-deep pyrosequencing (UDPS). To evaluate the UDPS error rate, an internal control sequence was inserted in the amplicon. A newly developed technique enabled simultaneous analysis of the preCore region and Pol in the same viral genome, as well as the conserved sequence of the internal control. Nucleotide errors in HindIII yielded a UDPS error rate $<0.05\%$. UDPS study confirmed the possibility of simultaneous detection of preCore and YMDD mutations, and demonstrated the complexity of the HBV quasispecies and cooperation between viruses. Thermodynamic stability of the ϵ signal was found to be the main constraint for selecting main preCore mutations. Analysis of ϵ -signal variability suggested the essential nature of the ϵ structural motif and that certain nucleotides may be involved in ϵ signal functions.

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) is a double-stranded DNA virus, whose genome (3.2 kb) contains four Open Reading

Frames (OPFs) encoding seven proteins: surface antigens (preS1, preS2 and HBsAg), polymerase (Pol), core protein (HBcAg), X protein (HBx) and the soluble 'e' antigen (HBeAg). During the viral cycle, HBV-DNA conformation shows different phases: relaxed-circular, partially double-stranded DNA in circulating viruses and covalently closed circular DNA (cccDNA) within the hepatocyte nucleus. cccDNA acts as a mini-chromosome within hepatocytes and transcribes five messenger RNA: preS1, preS2, X, preCore and pregenomic RNA (pgRNA). pgRNA is a greater than full-length HBV genome (3.5 kb) that codes for the Pol and HBcAg proteins. Pol has two catalytic activities, reverse transcriptase (RT) and RNaseH, and contains a spacer sequence and a terminal protein (1).

In both the 5'- and 3'-ends of pgRNA, there is a redundant sequence of 60 nt that adopts a stem loop structure (Figure 1a and b) and acts as encapsidation signal (ϵ). The 5' sequence is crucial for Pol protein recognition and binding to the 5' ϵ structure (2). Pol triggers pgRNA encapsidation by core proteins, and initiates reverse transcription (3). Pol employs an N terminal tyrosine residue of the terminal protein domain as a primer to generate the first 4 nt (4 nt primer) of the DNA negative strand. This 4 nt primer is covalently attached to Pol and uses the bulge of the ϵ signal as template (Figure 1a) (4). The 4 nt primer and Pol protein complex switches from the 5'- to 3'-end of pgRNA and anneals to a 4-nt acceptor site within the 3' copy of direct repeat region 1 (Figure 1b) (5).

pgRNA and preCore mRNA share the same preCore region, but code for different antigens: HBcAg (starting at Position 1901 of the HBV genome) and HBeAg (starting at Position 1814), respectively. Several preCore region mutations abolish HBeAg expression. The most common is G

Quasispecies dynamics in main core epitopes of hepatitis B virus by ultra-deep-pyrosequencing

Maria Homs, Maria Buti, David Tabernero, Josep Quer, Alex Sanchez, Noelia Corral, Rafael Esteban, Francisco Rodriguez-Frias

Maria Homs, Maria Buti, David Tabernero, Josep Quer, Rafael Esteban, Francisco Rodriguez-Frias, Network Medical Research Center, Hepatic and Digestive Diseases (CIBERehd), Institute of Health Carlos III, 08036 Barcelona, Spain

Maria Homs, David Tabernero, Noelia Corral, Francisco Rodriguez-Frias, Department of Biochemistry, Vall d'Hebron Hospital, Autonomous University of Barcelona, 08035 Barcelona, Spain

Maria Buti, Rafael Esteban, Department of Hepatology, Vall d'Hebron Hospital, Autonomous University of Barcelona, 08035 Barcelona, Spain

Alex Sanchez, Statistics and Bioinformatics Unit, Research Institute, Vall d'Hebron Hospital, 08035 Barcelona, Spain

Author contributions: Homs M and Rodriguez-Frias F designed the research; Homs M, Tabernero D and Corral N performed the experiments; Quer J contributed new analytic tools; Sanchez A analyzed the data; Homs M and Rodriguez-Frias F wrote the paper; Buti M, Esteban R and Rodriguez-Frias F contributed to the supervision of the manuscript writing.

Supported by A Grant from the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs, No. FIS PS09/00899 and SAF 2009-10403; CIBERehd Funded by Instituto Carlos III, Ministry of Health and Consumer Affairs

Correspondence to: Francisco Rodriguez-Frias, PhD, Department of Biochemistry, Vall d'Hebron Hospital, Autonomous University of Barcelona, Vall d'Hebron Avenue, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. frarodri@vhebron.net

Telephone: +34-93-2746991 Fax: +34-93-2746831

Received: May 16, 2012 Revised: July 25, 2012

Accepted: July 28, 2012

Published online: November 14, 2012

Abstract

AIM: To investigate the variability of the main immunodominant motifs of hepatitis B virus (HBV) core gene by ultra-deep-pyrosequencing (UDPS).

METHODS: Four samples (2 genotype A and 2 genotype D) from 4 treatment-naïve patients were assessed for baseline variability. Two additional samples from

one patient (patient 4, genotype D) were selected for analysis: one sample corresponded to a 36-mo treatment-free period from baseline and the other to the time of viral breakthrough after 18 mo of lamivudine treatment. The HBV region analyzed covered amino acids 40 to 95 of the core gene, and included the two main epitopic regions, Th50-69 and B74-84. UDPS was carried out in the Genome Sequencer FLX system (454 Life Sciences, Roche). After computer filtering of UDPS data based on a Poisson statistical model, 122 813 sequences were analyzed. The most conserved position detected by UDPS was analyzed by site-directed mutagenesis and evaluated in cell culture.

RESULTS: Positions with highest variability rates were mainly located in the main core epitopes, confirming their role as immune-stimulating regions. In addition, the distribution of variability showed a relationship with HBV genotype. Patient 1 (genotype A) presented the lowest variability rates and patient 2 (genotype A) had 3 codons with variability higher than 1%. Patient 3 and 4 (both genotype D) presented 5 and 8 codons with variability higher than 1%, respectively. The median baseline frequencies showed that genotype A samples had higher variability in epitopic positions than in the other positions analyzed, approaching significance ($P = 0.07$, sample 1 and $P = 0.05$, sample 2). In contrast, there were no significant differences in variability between the epitopic and other positions in genotype D cases. Interestingly, patient 1 presented a completely mutated motif from amino acid 64 to 67 ($E_{64}LMT_{67}$), which is commonly recognized by T helper cells. Additionally, the variability observed in all 4 patients was particularly associated with the $E_{64}LMT_{67}$ motif. Codons 78 and 79 were highly conserved in all samples, in keeping with their involvement in the interaction between the HBV virion capsid and the surface antigens (HBsAg). Of note, codon 76 was even more conserved than codons 78 and 79, suggesting a possible role in HBsAg interactions or even in hepatitis B e antigen



A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection as a model



Clara Ramírez^a, Josep Gregori^b, Maria Buti^{c,d}, David Tabernero^{a,d}, Sílvia Camós^{a,d}, Rosario Casillas^{a,b}, Josep Quer^{b,d}, Rafael Esteban^{c,d}, Maria Homs^{a,d}, Francisco Rodriguez-Frías^{a,d,*}

^a Biochemistry Department, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^b Liver Unit, Research Institute Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^c Hepatology Department, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto Carlos III, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2012

Revised 5 March 2013

Accepted 11 March 2013

Available online 20 March 2013

Keywords:

Quasispecies

HBV

Ultra-deep pyrosequencing

Cloning

Polymorphic positions

Haplotypes

ABSTRACT

In this study, the reliability and reproducibility of viral quasispecies quantification by three ultra-deep pyrosequencing (UDPS) methods (FLX+, FLX, and Junior) were investigated and results compared with the conventional cloning technique. Hepatitis B virus (HBV) infection was selected as the model. The pre-Core/Core region, the least overlapped HBV region, was analyzed in samples from a chronic hepatitis B patient by cloning and by UDPS.

After computation filtering of the UDPS results, samples A1 and A2 (FLX+) and sample B (FLX) yielded the same 20 polymorphic positions. Junior yielded 18 polymorphic positions that coincided with the FLX results. In contrast, 50 polymorphic positions were detected by cloning. Quasispecies complexity plotted on graphs showed superimposed patterns and the quantitative parameters were similar between FLX+, FLX, Junior, and the cloning sequences. Twenty-two haplotypes were detected by Junior, and 37, 40, and 39 were detected by FLX A1, A2, and B, respectively. These differences may be attributable to methodological differences between FLX and Junior. By cloning, 47 haplotypes were detected. Eight clones with insertions and deletions that induced *de novo* stop codons were not observed by UDPS because the UDPS filter discarded them.

Our results indicate that UDPS is an optimal alternative to molecular cloning for quantitative study of the viral quasispecies. Nonetheless, specific mutations, such as insertions and deletions, were only detected by cloning. A filter should be designed to analyze cloning sequences, and UDPS filters should be improved to include the specific mutations.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Clinical Application of Estimating Hepatitis B Virus Quasispecies Complexity by Massive Sequencing: Correlation between Natural Evolution and On-Treatment Evolution

Maria Homs^{1,2,3}, Andrea Caballero², Josep Gregori^{1,4}, David Tabernero^{1,2,3}, Josep Quer^{1,4}, Leonardo Nieto^{2,3}, Rafael Esteban^{1,5}, Maria Buti^{1,5}, Francisco Rodriguez-Frias^{1,2,3*}

1 Centro de investigación biomédica en red: enfermedades hepáticas y digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain, **2** Liver Pathology Unit, Departments of Biochemistry and Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Virology Unit, Department of Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Liver Diseases, Research Institute Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, **5** Liver Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Aim: To evaluate HBV quasispecies (QA) complexity in the preCore/Core regions in relation to HBeAg status, and explore QA changes under natural evolution and nucleoside analogue (NUC) treatment.

Methods: Ultra-deep pyrosequencing of HBV preCore/Core regions in 30 sequential samples (baseline [diagnosis], treatment-free, and treatment-nonresponse) from 10 retrospectively selected patients grouped according to HBeAg status over time: HBeAg+ (N = 4), HBeAg- (N = 2), and fluctuating HBeAg (transient seroreversion/seroconversion pattern) (N = 4). QA complexity was defined by Shannon entropy, mutation frequency, nucleotide diversity, and mutation frequency of amino acids (MfAA) in preCore and Core.

Results: The QA was less complex in HBeAg+ than in HBeAg- or fluctuating HBeAg. High complexity in preCore was associated with decreased viral replication (preCore MfAA negatively correlated with HBV-DNA, $p = 0.005$). QA complexity in the treatment-free period negatively correlated with values seen during treatment. Specific variants were mainly selected in the Core region in HBeAg- and fluctuating HBeAg patients, suggesting higher immune pressure than in HBeAg+.

Conclusions: The negative correlation between QA natural evolution and on-treatment evolution indicates the importance of pre-treatment QA study to predict QA changes in NUC nonresponders. Study of QA complexity could be useful for managing HBV infection.

Citation: Homs M, Caballero A, Gregori J, Tabernero D, Quer J, et al. (2014) Clinical Application of Estimating Hepatitis B Virus Quasispecies Complexity by Massive Sequencing: Correlation between Natural Evolution and On-Treatment Evolution. PLoS ONE 9(11): e112306. doi:10.1371/journal.pone.0112306

Editor: Anna Kramvis, University of the Witwatersrand, South Africa

Received: April 2, 2014; **Accepted:** October 14, 2014; **Published:** November 13, 2014

Copyright: © 2014 Homs et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. In addition, UDPS sequencing data are available from the GenBank SRA database (BioProject and BioSample accession numbers are provided within the manuscript).

Funding: This study was funded by Instituto de Salud Carlos III (grant PI12/01893), cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: frarodri@vhebron.net



Tenofovir discontinuation after long-term viral suppression in HBeAg negative chronic hepatitis B. Can HBsAg levels be useful?



Maria Buti^{a,b,*}, Rosario Casillas^b, Mar Riveiro-Barciela^b, Maria Homs^{a,c}, David Tabernero^{a,c}, Maria Teresa Salcedo^d, Francisco Rodriguez-Frias^{a,c}, Rafael Esteban^{a,b}

^a Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^b Liver Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Liver Pathology Unit, Departments of Biochemistry and Microbiology (Virology Unit) Hospital Universitari Vall d'Hebron and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^d Pathology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 08035, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2014

Received in revised form 30 April 2015

Accepted 7 May 2015

Keywords:

TDF discontinuation

HBeAg chronic hepatitis B

Sustained response

HBsAg levels

HBsAg loss

ABSTRACT

Background: Recent studies have shown that antiviral treatment discontinuation is safe and associated with virologic remission in HBeAg-negative patients. However, the period of viral suppression and follow-up in these studies was relatively short.

Objectives: To investigate whether continuous viral suppression with tenofovir disoproxil fumarate for more than 7 years is associated with HBsAg loss and sustained response after treatment discontinuation and receiving a full course of hepatitis B vaccination.

Study design: Patients with HBeAg-negative chronic HBV infection and more than 7 years of persistent viral suppression with tenofovir therapy were selected for treatment discontinuation and HBV vaccination. Follow-up with monthly ALT, HBV-DNA, and HBsAg determinations lasted 72 weeks. In patients with viral relapse, the viral quasispecies in the overlapping reverse transcriptase and small surface protein regions was analysed by ultra-deep pyrosequencing.

Results: Eight of 17 HBeAg-negative patients accepted tenofovir discontinuation: 5 patients achieved sustained response (persistent HBV-DNA levels <2000 IU/mL and normal ALT) despite an initial virologic relapse, one lost HBsAg, and two needed re-treatment. All patients with an on-treatment HBsAg level decline >5000 IU/mL achieved sustained response. Patients with HBeAg level <100 IU/mL during an ALT flare after antiviral discontinuation achieved sustained response. Significant changes were seen in the composition of the HBV quasispecies, and half the patients showed changes in HBV genotype.

Conclusions: Even though the majority of patients presented an initial relapse with selection of HBV variants, most achieved sustained response. Changes in HBsAg levels on and off treatment may be useful for predicting the likelihood of virologic remission.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

REFERENCIES BIBLIOGRÀFIQUES

10. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES:

1. WHO Media centre. Fact sheet N°204 [Internet]. 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
2. Gust I, Burrell C, Coulepis A. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology*. 1986;25:14–29.
3. Blumberg BS, Alter HJ. A “New” Antigen in Leukemia Sera. *JAMA J Am Med Assoc*. 1965;191(7):541–6.
4. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA J Am Med Assoc*. 1967;200(5):365–73.
5. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down’s syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*. 1967;66(5):924–31.
6. Blumberg BS, Sutnick AI, London WT. Australia antigen and hepatitis. *JAMA J Am Med Assoc*. 1969;207(10):1895–6.
7. Giles JP, McCollum RW, Berndtson LW, Krugman S. Relation of Australia-SH antigen to the willowbrook MS-2 strain. *N Engl J Med*. 1969;281(3):119–22.
8. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970;1(7649):695–8.
9. Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet*. 1971;2(7736):1225–7.
10. Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol*. 1973;12(5):995–1005.
11. Robinson WS, Clayton D a, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol*. 1974;14(2):384–91.
12. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*. 1984;52(2):396–402.
13. Zhou S, Standring DN. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10046–50.
14. Wynne S a, Crowther R a, Leslie a G. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell*. 1999;3(6):771–80.
15. Roseman AM, Berriman J a, Wynne S a, Butler PJG, Crowther RA. A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(44):15821–6.

16. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):48–64.
17. Nassal M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res.* 2008;134(1-2):235–49.
18. Kann M, Gerlich WH. Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol.* 1994;68(12):7993–8000.
19. Schädler S, Hildt E. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses.* 2009;1(2):185–209.
20. Huovila a. PJ, Eder a. M, Fuller SD. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol.* 1992;118(6):1305–20.
21. Gilbert RJC, Beales L, Blond D, Simon MN, Lin BY, Chisari F V, et al. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(41):14783–8.
22. Luangsay S, Zoulim F. Structure and molecular virology. In: Thomas HC, Lok AS, Locarnini SA, Zuckerman AJ, editors. *Viral Hepatitis. Fourth.* Wiley Blackwell; 2013. p. 65–80.
23. Persing DH, Varmus HE, Ganem D. Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide. *Science.* 1986;234(4782):1388–91.
24. Ou JH, Rutter WJ. Regulation of secretion of the hepatitis B virus major surface antigen by the preS-1 protein. *J Virol.* 1987;61(3):782–6.
25. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):65–73.
26. Gavilanes F, Gonzalez-Ros JM, Peterson DL. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem.* 1982;257(13):7770–7.
27. Hygiene und Med. Mikrobiologie. UniversitätsKlinikum Heidelberg: Hepatitis B Virus [Internet]. *Molekulare Virologie.* 2006 [cited 2015 Apr 3]. Available from: <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/HBV.104919.0.html>
28. Summers J, O’Connell a, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(11):4597–601.
29. Landers T a, Greenberg HB, Robinson WS. Structure of Hepatitis B Dane Particle DNA and Nature of the Reaction Structure of Hepatitis B Dane Particle DNA and Nature of the Endogenous DNA Polymerase Reaction. *J Virol.* 1977;23(2):368.
30. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* 1982;29(2):403–15.

31. Weber M, Bronsema V, Bartos H, Bosserhoff a, Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol.* 1994;68(5):2994–9.
32. Zoulim F, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol.* 1994;68(1):6–13.
33. Lanford RE, Notvall L, Lee H, Beames B. Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase. *J Virol.* 1997;71(4):2996–3004.
34. Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia M. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris).* Elsevier Masson SAS; 2010;58(4):267–72.
35. Ruiz-Opazo N, Chakraborty PR, Shafritz DA. Evidence for supercoiled hepatitis B virus DNA in chimpanzee liver and serum Dane particles: possible implications in persistent HBV infection. *Cell.* 1982;29(1):129–36.
36. Mason WS, Halpern MS, England JM, Seal G, Egan J, Coates L, et al. Experimental transmission of duck hepatitis B virus. *Virology.* 1983;131(2):375–84.
37. Mason WS, Aldrich C, Summers J, Taylor JM. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(13):3997–4001.
38. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell.* Elsevier; 1986;47(3):451–60.
39. Bock CT, Schranz P, Schröder CH, Zentgraf H. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes.* 1994;8(3):215–29.
40. Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, et al. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol.* 1995;69(6):3350–7.
41. Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol.* 2001;307(1):183–96.
42. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 1974;184(139):868–71.
43. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(47):19975–9.
44. Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature.* 1980;286(5772):533–5.
45. Pollicino T, Saitta C, Raimondo G. Hepatocellular carcinoma: the point of view of the hepatitis B virus. *Carcinogenesis.* 2011;32(8):1122–32.

46. Bréchet C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: Old and new paradigms. *Gastroenterology*. 2004;127(SUPPL.):S56–61.
47. Guerrero RB, Roberts LR. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2005. p. 760–77.
48. Feitelson M a., Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*. 2007;252(2):157–70.
49. Dejean a, Sonigo P, Wain-Hobson S, Tiollais P. Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(17):5350–4.
50. Yang W, Summers J. Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination. *J Virol*. 1995;69(7):4029–36.
51. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Bréchet C, et al. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2005;54(8):1162–8.
52. Lubber B, Arnold N, Stürzl M, Höhne M, Schirmacher P, Lauer U, et al. Hepatoma-derived integrated HBV DNA causes multi-stage transformation in vitro. *Oncogene*. 1996;12(8):1597–608.
53. Schlüter V, Meyer M, Hofschneider PH, Koshy R, Caselmann WH. Integrated hepatitis B virus X and 3' truncated preS/S sequences derived from human hepatomas encode functionally active transactivators. *Oncogene*. 1994;9(11):3335–44.
54. Slagle BL, Zhou YZ, Butel JS. Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17p near the p53 gene identifies the region of the chromosome commonly deleted in virus-positive hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*. 1991;51(1):49–54.
55. Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, Kanehisa M, Enomoto M, Tanaka H, et al. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5821–6.
56. Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik KH, Tiollais P. Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature*. 1986;322(6074):70–2.
57. Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Bréchet C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*. 1990;343(6258):555–7.
58. Charnay P, Pourcel C, Louise A, Fritsch A, Tiollais P. Cloning in *Escherichia coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(5):2222–6.
59. Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*. 1979;281(5733):646–50.
60. Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, et al. Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature*. 1979;282(5739):575–9.

61. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*. 2008;80(1):27–46.
62. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2007;13(1):14–21.
63. Panjaworayan N, Roessner SK, Firth AE, Brown CM. HBVRegDB: annotation, comparison, detection and visualization of regulatory elements in hepatitis B virus sequences. *Virology*. 2007;4:136.
64. Magnusius L, Espmark JÅ. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J Immunol*. 1972;109(5):1017–21.
65. Bruss V, Gerlich WH. Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology*. 1988;163(2):268–75.
66. Standring DN, Ou JH, Masiarz FR, Rutter WJ. A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(22):8405–9.
67. Chang C, Enders G, Sprengel R, Peters N, Varmus HE, Ganem D. Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication. *J Virol*. 1987;61(10):3322–5.
68. Messageot F, Salhi S, Eon P, Rossignol JM. Proteolytic processing of the Hepatitis B virus e antigen precursor: Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem*. 2003;278(2):891–5.
69. Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, et al. Hepatitis B virus DNA-negative dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem*. 2005;280(23):21713–9.
70. Wasenauer G, Köck J, Schlicht HJ. A cysteine and a hydrophobic sequence in the noncleaved portion of the pre-C leader peptide determine the biophysical properties of the secretory core protein (HBe protein) of human hepatitis B virus. *J Virol*. 1992;66(9):5338–46.
71. Lang T, Lo C, Skinner N, Locarnini S, Visvanathan K, Mansell A. The Hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the Toll-like receptor signaling pathway. *J Hepatol*. European Association for the Study of the Liver; 2011;55(4):762–9.
72. Milich DR, Schödel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J Virol*. 1997;71(3):2192–201.
73. Visvanathan K, Skinner N a., Thompson AJ V, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology*. 2007;45(1):102–10.

74. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(17):6599–603.
75. Creagh EM, O'Neill LAJ. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends Immunol*. 2006;27(8):352–7.
76. Milich DR, McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science*. 1986;234(4782):1398–401.
77. Locarnini S, Shaw T, Dean J, Colledge D, Thompson A, Li K, et al. Cellular response to conditional expression of the hepatitis B virus precore and core proteins in cultured hepatoma (Huh-7) cells. *J Clin Virol*. 2005;32(2):113–21.
78. Yang H-I, Lu S-N, Liaw Y-F, You S-L, Sun C-A, Wang L-Y, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2002;347(3):168–74.
79. Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(14):6459–63.
80. Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*. 2001;44(2-3):98–114.
81. Gallina A, Bonelli F, Zentilin L, Rindi G, Muttini M, Milanese G. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J Virol*. 1989;63(11):4645–52.
82. Li H-C, Huang E-Y, Su P-Y, Wu S-Y, Yang C-C, Lin Y-S, et al. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001162.
83. Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol*. 2005;79(15):9810–20.
84. Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol*. 1999;145(1):45–55.
85. Böttcher B, Wynne SA, Crowther RA. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*. 1997;386(6620):88–91.
86. Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol*. 1990;64(2):613–20.
87. Urban M, McMillan DJ, Canning G, Newell A, Brown E, Mills JS, et al. In vitro activity of hepatitis B virus polymerase: Requirement for distinct metal ions and the viral epsilon stem-loop. *J Gen Virol*. 1998;79(5):1121–31.
88. Stahl M, Beck J, Nassal M. Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C-proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding. *J Virol*. 2007;81(24):13354–64.

89. Lanford RE, Kim YH, Lee H, Notvall L, Beames B. Mapping of the hepatitis B virus reverse transcriptase TP and RT domains by transcomplementation for nucleotide priming and by protein-protein interaction. *J Virol.* 1999;73(3):1885–93.
90. Shin YC, Ko C, Ryu WS. Hydrophobic residues of terminal protein domain of hepatitis B virus polymerase contribute to distinct steps in viral genome replication. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies;* 2011;585(24):3964–8.
91. Kim S, Lee J, Ryu W-S. Four conserved cysteine residues of the hepatitis B virus polymerase are critical for RNA pregenome encapsidation. *J Virol.* 2009;83(16):8032–40.
92. Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 1990;9(10):3389–96.
93. Bartenschlager R, Junker-Niepmann M, Schaller H. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol.* 1990;64(11):5324–32.
94. Kamtekar S, Berman AJ, Wang J, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, et al. The phi29 DNA polymerase:protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition. *EMBO J.* 2006;25(6):1335–43.
95. Berman AJ, Kamtekar S, Goodman JL, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, et al. Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J.* 2007;26(14):3494–505.
96. Paul A V, Rieder E, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol.* 2000;74(22):10359–70.
97. Paul A V, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature.* 1998;393(6682):280–4.
98. Cao F, Badtke MP, Metzger LM, Yao E, Adeyemo B, Gong Y, et al. Identification of an essential molecular contact point on the duck hepatitis B virus reverse transcriptase. *J Virol.* 2005;79(16):10164–70.
99. Badtke MP, Khan I, Cao F, Hu J, Tavis JE. An interdomain RNA binding site on the hepadnaviral polymerase that is essential for reverse transcription. *Virology.* 2009;390(1):130–8.
100. Xiong Y, Eickbush TH. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 1990;9(10):3353–62.
101. Li MD, Bronson DL, Lemke TD, Faras AJ. Phylogenetic analyses of 55 retroelements on the basis of the nucleotide and product amino acid sequences of the pol gene. *Mol Biol Evol.* 1995;12(4):657–70.
102. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 1989;8(12):3867–74.

103. Das K, Xiong X, Yang H, Westland CE, Gibbs CS, Sarafianos SG, et al. Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC). *J Virol.* 2001;75(10):4771–9.
104. Bartholomeusz A, Tehan BG, Chalmers DK. Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations. *Antivir Ther.* 2004;9(2):149–60.
105. Stuyver L, Locarnini S a., Lok AS, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology.* 2001;33(3):751–7.
106. Wang Y-X, Luo C, Zhao D, Beck J, Nassal M. Extensive Mutagenesis of the Conserved Box E Motif in Duck Hepatitis B Virus P Protein Reveals Multiple Functions in Replication and a Common Structure with the Primer Grip in HIV-1 Reverse Transcriptase. *J Virol.* 2012;86(12):6394–407.
107. Beck J, Vogel M, Nassal M. dNTP versus NTP discrimination by phenylalanine 451 in duck hepatitis B virus P protein indicates a common structure of the dNTP-binding pocket with other reverse transcriptases. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(7):1679–87.
108. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples G a, Walters KA, Tyrrell DL, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology.* 1998;27(6):1670–7.
109. Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, et al. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol.* 2007;81(8):3992–4001.
110. Daga PR, Duan J, Doerksen RJ. Computational model of hepatitis B virus DNA polymerase: Molecular dynamics and docking to understand resistant mutations. *Protein Sci.* 2010;19(4):796–807.
111. Doublé S, Sawaya MR, Ellenberger T. An open and closed case for all polymerases. *Structure.* 1999;7(2):31–5.
112. Steitz T a. DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms. *J Biol Chem.* 1999;274(25):17395–8.
113. Kohlstaedt L a, Wang J, Friedman JM, Rice P a, Steitz T a. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science.* 1992;256(5065):1783–90.
114. Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science.* 1998;282(5394):1669–75.
115. Jacobo-Molina a, Ding J, Nanni RG, Clark a D, Lu X, Tantillo C, et al. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(13):6320–4.

116. Kamer G, Argos P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res. Oxford Univ Press*; 1984;12(18):7269–82.
117. Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology*. 1998;27(2):628–33.
118. Bakhanashvili M, Avidan O, Hizi A. Mutational studies of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: The involvement of residues 183 and 184 in the fidelity of DNA synthesis. *FEBS Lett*. 1996;391(3):257–62.
119. Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, et al. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol*. 1994;243(3):369–87.
120. Chen Y, Marion PL. Amino acids essential for RNase H activity of hepadnaviruses are also required for efficient elongation of minus-strand viral DNA. *J Virol*. 1996;70(9):6151–6.
121. Nowotny M, Gaidamakov S a., Crouch RJ, Yang W. Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: Substrate specificity and metal-dependent catalysis. *Cell*. 2005;121(7):1005–16.
122. Tavis JE, Cheng X, Hu Y, Totten M, Cao F, Michailidis E, et al. The Hepatitis B Virus Ribonuclease H Is Sensitive to Inhibitors of the Human Immunodeficiency Virus Ribonuclease H and Integrase Enzymes. *PLoS Pathog*. 2013;9(1).
123. Chen Y, Robinson WS, Marion PL. Selected mutations of the duck hepatitis B virus P gene RNase H domain affect both RNA packaging and priming of minus-strand DNA synthesis. *J Virol*. 1994;68(8):5232–8.
124. Jones S a, Hu J. Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2(9):e56.
125. Li J, Du Y, Liu X, Shen Q, Huang A, Zheng M, et al. Binding sensitivity of adefovir to the polymerase from different genotypes of HBV: molecular modeling, docking and dynamics simulation studies. *Acta Pharmacol Sin. Nature Publishing Group*; 2013;34(2):319–28.
126. Patzer EJ, Nakamura GR, Simonsen CC, Levinson AD, Brands R. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 1986;58(3):884–92.
127. Eble BE, MacRae DR, Lingappa VR, Ganem D. Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol*. 1987;7(10):3591–601.
128. Levene C, Blumberg BS. Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature*. 1969;221(5176):195–6.
129. Le Bouvier GL. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis*. 1971;123(6):671–5.

130. Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol.* 1972;109(4):842–8.
131. Le Bouvier GL, McCollum RW, Hierholzer WJ, Irwin GR, Krugman S, Giles JP. Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus. *JAMA J Am Med Assoc.* 1972;222(8):928–30.
132. Couroucé AM, Soulier JP. The a(w) subdeterminants. *Bibl Haematol.* 1976;42:31–41.
133. Magnus L, Kaplan L, Vyas GN, Perkins HA. A new virus specified determinant of hepatitis B surface antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* 1975;83(3):295–7.
134. Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang.* 1983;44(4):197–211.
135. Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Couroucé AM, Magnus LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol.* 1992;73 (Pt 5):1201–8.
136. Norder H, Couroucé a. M, Magnus LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol.* 1992;73(12):3141–5.
137. Yano Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J Hepatol.* 2015;7(3):583.
138. Van Hemert FJ, Zaaijer HL, Berkhout B, Lukashov V V. Mosaic amino acid conservation in 3D-structures of surface protein and polymerase of hepatitis B virus. *Virology.* 2008;370(2):362–72.
139. Short JM, Chen S, Roseman AM, Butler PJG, Crowther RA. Structure of Hepatitis B Surface Antigen from Subviral Tubes Determined by Electron Cryomicroscopy. *J Mol Biol.* 2009;390(1):135–41.
140. Ashton-Rickardt PG, Murray K. Mutants of the hepatitis B virus surface antigen that define some antigenically essential residues in the immunodominant a region. *J Med Virol.* 1989;29(3):196–203.
141. Huang L-M, Lu C-Y, Chen D-S. Hepatitis B virus infection, its sequelae, and prevention by vaccination. *Curr Opin Immunol. Elsevier Ltd;* 2011;23(2):237–43.
142. Allain JP, Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors. *Curr Opin Hematol.* 2011;18(6):461–6.
143. Alavian SM, Carman WF, Jazayeri SM. HBsAg variants: Diagnostic-escape and diagnostic dilemma. *J Clin Virol. Elsevier B.V.;* 2013;57(3):201–8.
144. Avellón A, Echevarria J-M. Frequency of hepatitis B virus “a” determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol.* 2006;78(1):24–36.
145. Ma Q, Wang Y. Comprehensive analysis of the prevalence of hepatitis B virus escape mutations in the major hydrophilic region of surface antigen. *J Med Virol.* 2012;84(2):198–206.

146. Lu X, Mehta a, Dwek R, Butters T, Block T. Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion. *Virology*. 1995;213(2):660–5.
147. 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.
148. Wounderlich G, Bruss V. Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch Virol*. 1996;141(7):1191–205.
149. Mangold CM, Streeck RE. Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol*. 1993;67(8):4588–97.
150. Mangold CM, Unckell F, Werr M, Streeck RE. Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region. *Virology*. 1995;211(2):535–43.
151. Eble BE, Lingappa VR, Ganem D. The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol*. 1990;64(3):1414–9.
152. Schmitt S, Glebe D, Alving K, Tolle TK, Linder M, Geyer H, et al. Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11945–57.
153. Schmitt S, Glebe D, Tolle TK, Lochnit G, Linder D, Geyer R, et al. Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J Gen Virol*. 2004;85(7):2045–53.
154. Fernholz D, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H. Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. *J Hepatol*. 1991;13 Suppl 4:S102–4.
155. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*. 2007;13(1):22–38.
156. Hildt E, Urban S, Hofschneider PH. Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene*. 1995;11(10):2055–66.
157. Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J*. 2002;21(4):525–35.
158. Bruss V, Lu X, Thomssen R, Gerlich WH. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J*. 1994;13(10):2273–9.
159. Ostapchuk P, Hearing P, Ganem D. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J*. 1994;13(5):1048–57.

160. Prange R, Streeck RE. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.* 1995;14(2):247–56.
161. Persing DH, Varmus HE, Ganem D. The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol.* 1987;61(5):1672–7.
162. Bruss V, Hagelstein J, Gerhardt E, Galle PR. Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology.* 1996;218(2):396–9.
163. Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, Guguen-Guillouzo C. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology.* 1995;213(2):292–9.
164. Gazina E, Gallina A, Milanesi G. Common localization of retention determinants in hepatitis B virus L protein from different strains. *J Gen Virol.* 1996;77 (Pt 12):3069–75.
165. Prange R, Clemen A, Streeck RE. Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol.* 1991;65(7):3919–23.
166. Lambert C, Prange R. Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5199–204.
167. Löffler-Mary H, Werr M, Prange R. Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology.* 1997;235(1):144–52.
168. Bruss V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol.* 1997;71(12):9350–7.
169. Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology.* 1996;225(1):235–9.
170. Awe K, Lambert C, Prange R. Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett.* 2008;582(21-22):3179–84.
171. Lambert C, Prange R. Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein. Determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22265–72.
172. Hadziyannis S, Gerber MA, Vissoulis C, Popper H. Cytoplasmic hepatitis B antigen in “ground-glass” hepatocytes of carriers. *Arch Pathol.* 1973;96(5):327–30.
173. Su IJ, Wang HC, Wu HC, Huang WY. Ground glass hepatocytes contain pre-S mutants and represent preneoplastic lesions in chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(8 PART1):1169–74.
174. Tai PC, Banik D, Lin GI, Pai S, Pai K, Lin MH, et al. Novel and frequent mutations of hepatitis B virus coincide with a major histocompatibility complex class I-restricted T-cell epitope of the surface antigen. *J Virol.* 1997;71(6):4852–6.
175. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet.* 1990;336(8711):325–9.

176. Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis.* 2013;33(2):103–12.
177. Patient R, Hourieux C, Sizaret P-Y, Trassard S, Sureau C, Roingeard P. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol.* 2007;81(8):3842–51.
178. Patient R, Hourieux C, Roingeard P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cellular Microbiology.* 2009. p. 1561–70.
179. Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, Shi CC, Janssen HLA. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One.* 2011;6(1):e15324.
180. Op den Brouw ML, Binda RS, van Roosmalen MH, Protzer U, Janssen HLA, van der Molen RG, et al. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology.* 2009;126(2):280–9.
181. Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S, Glebe D, Grün S, Strand D, et al. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):61–70.
182. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature.* 1984;307(5947):178–80.
183. Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol.* 1998;72(2):1462–8.
184. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci.* 2006;97(10):977–83.
185. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015;479-480:672–86.
186. Feitelson MA, Miller RH. X gene-related sequences in the core gene of duck and heron hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85(16):6162–6.
187. Suh A, Brosius J, Schmitz J, Kriegs JO. The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses. *Nat Commun.* 2013;4:1791.
188. Tiollais P, Charnay P, Vyas GN. Biology of hepatitis B virus. *Science.* 1981;213(4506):406–11.
189. Xie N, Chen X, Zhang T, Liu B, Huang C. Using proteomics to identify the HBx interactome in hepatitis B virus: how can this inform the clinic? *Expert Rev Proteomics.* Informa UK, Ltd.; 2014;11(1):59–74.
190. Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremisdorf D, Bréchet C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene.* 1999;18(34):4848–59.

191. Wang D, Cai H, Yu W-B, Yu L. Identification of hepatitis B virus X gene variants between hepatocellular carcinoma tissues and pericarcinoma liver tissues in Eastern China. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):5988–96.
192. Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, et al. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res*. 2001;61(21):7803–10.
193. Kumar V, Jayasuryan N, Kumar R. A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(11):5647–52.
194. Murakami S, Cheong JH, Kaneko S. Human hepatitis virus X gene encodes a regulatory domain that represses transactivation of X protein. *J Biol Chem*. 1994;269(21):15118–23.
195. Zheng D-L, Zhang L, Cheng N, Xu X, Deng Q, Teng X-M, et al. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A. *J Hepatol*. 2009;50(2):377–87.
196. Mukherji A, Janbandhu VC, Kumar V. HBx-dependent cell cycle deregulation involves interaction with cyclin E/A-cdk2 complex and destabilization of p27Kip1. *Biochem J*. 2007;401(1):247–56.
197. Keng VW, Tschida BR, Bell JB, Largaespada DA. Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system. *Hepatology*. 2011;53(3):781–90.
198. Kumar M, Jung SY, Hodgson AJ, Madden CR, Qin J, Slagle BL. Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon. *J Virol*. 2011;85(2):987–95.
199. Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol*. 1998;72(1):266–72.
200. Sitterlin D, Bergametti F, Tiollais P, Tennant BC, Transy C. Correct binding of viral X protein to UVDDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses. *Oncogene*. 2000;19(38):4427–31.
201. Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J Virol*. 2005;79(7):4238–45.
202. Quasdorff M, Protzer U. Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *J Viral Hepat*. 2010;17(8):527–36.
203. Cougot D, Wu Y, Cairo S, Caramel J, Renard C-A, Lévy L, et al. The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2007;282(7):4277–87.
204. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*. European Association for the Study of the Liver; 2011;55(5):996–1003.

205. Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*. 2006;130(3):823–37.
206. Kramvis a, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat*. 1999;6(6):415–27.
207. Raney a K, Milich DR, McLachlan a. Complex regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter in human hepatoma cell lines. *J Virol*. 1991;65(9):4805–11.
208. Raney AK, Le HB, McLachlan A. Regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter by the Sp1 transcription factor. *J Virol*. 1992;66(12):6912–21.
209. Zhou DX, Yen TSB. The hepatitis B virus S promoter comprises A CCAAT motif and two initiation regions. *J Biol Chem*. 1991;266(34):23416–21.
210. Treinin M, Laub O. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol Cell Biol*. 1987;7(1):545–8.
211. Guo WT, Bell KD, Ou JH. Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex. *J Virol*. 1991;65(12):6686–92.
212. Moolla N, Kew M, Arbuthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *Journal of Viral Hepatitis*. 2002. p. 323–31.
213. Su TS, Lai CJ, Huang JL, Lin LH, Yauk YK, Chang CM, et al. Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. *J Virol*. 1989;63(9):4011–8.
214. Terré S, Petit M a, Bréchet C. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J Virol*. 1991;65(10):5539–43.
215. Günther S, Sommer G, Iwanska A, Will H. Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology*. 1997;238(2):363–71.
216. Rosmorduc O, Petit MA, Pol S, Capel F, Bortolotti F, Berthelot P, et al. In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology*. 1995;22(1):10–9.
217. Soussan P, Garreau F, Zylberberg H, Ferray C, Brechet C, Kremsdorf D. In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest*. 2000;105(1):55–60.
218. Soussan P, Tuveri R, Nalpas B, Garreau F, Zavala F, Masson A, et al. The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *J Hepatol*. 2003;38(3):343–8.
219. Yuh CH, Chang YL, Ting LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol*. 1992;66(7):4073–84.

220. Shaul Y, Rutter WJ, Laub O. A human hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.* 1985;4(2):427–30.
221. Yu X, Mertz JE. Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *J Virol.* 1996;70(12):8719–26.
222. Colgan J, Manley JL. Cooperation between core promoter elements influences transcriptional activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(6):1955–9.
223. Chen IH, Huang CJ, Ting LP. Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of hepatitis B virus. *J Virol.* 1995;69(6):3647–57.
224. Chen M, Ou JH. Cell type-dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter. *Virology.* 1995;214(1):198–206.
225. Lo WY, Ting LP. Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome. *J Virol.* 1994;68(3):1758–64.
226. Yu X, Mertz JE. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J Virol.* 1997;71(12):9366–74.
227. Yuh CH, Ting LP. The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function. *J Virol.* 1990;64(9):4281–7.
228. Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(3):566–70.
229. Raney AK, Easton AJ, McLachlan A. Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter. *J Gen Virol.* 1994;75(10):2671–9.
230. Raney AK, McLachlan A. Characterization of the hepatitis B virus large surface antigen promoter Sp1 binding site. *Virology.* 1995;208(1):399–404.
231. Raney AK, Zhang P, McLachlan A, Easton AJ, McLachlan A. Regulation of transcription from the hepatitis B virus large surface antigen promoter by hepatocyte nuclear factor 3. *J Gen Virol.* 1994;69(6):2671–9.
232. Cattaneo R, Will H, Hernandez N, Schaller H. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature.* 1983;305(5932):336–8.
233. Lu CC, Yen TS. Activation of the hepatitis B virus S promoter by transcription factor NF-Y via a CCAAT element. *Virology.* 1996;225(2):387–94.
234. Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology.* 1999;29(4):1236–47.
235. Lu CC, Chen M, Ou JH, Yen TS. Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression. *Virology.* 1995;206(2):1155–8.

236. Xu Z, Jensen G, Yen TS. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 1997;71(10):7387–92.
237. Zhang P, Raney AK, McLachlan A. Characterization of the hepatitis B virus X- and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements. *Virology*. 1992;191(1):31–41.
238. Zheng Y, Riegler J, Wu J, Ye TSB. Novel Short Transcripts of Hepatitis. *J Biol Chem*. 1994;269(36):22593–8.
239. Chen M, Hieng S, Qian X, Costa R, Ou J-H. Regulation of Hepatitis B Virus ENI Enhancer Activity by Hepatocyte-Enriched Transcription Factor HNF3. *Virology*. 1994;205(1):127–32.
240. Fukai K, Takada S, Yokosuka O, Saisho H, Omata M, Koike K. Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell. *Virology*. 1997;236(2):279–87.
241. Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K. Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system. *Virology*. 1996;216(1):80–9.
242. Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, Shafritz DA. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(6):1627–31.
243. Chou CK, Wang LH, Lin HM, Chi CW. Glucocorticoid stimulates hepatitis B viral gene expression in cultured human hepatoma cells. *Hepatology*. 1992;16(1):13–8.
244. Hoofnagle JH. Reactivation of hepatitis B. *Hepatology*. 2009;49(SUPPL. 5).
245. Reed R. Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(3):326–31.
246. Huang J, Liang TJ. A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol*. 1993;13(12):7476–86.
247. Lee GH, Wasser S, Lim SG. Hepatitis B pregenomic RNA splicing--the products, the regulatory mechanisms and its biological significance. *Virus Res*. 2008;136(1-2):1–7.
248. Chen A. Prospects for inhibiting the post-transcriptional regulation of gene expression in hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*. 2014;20(25):7993.
249. Smith GJ, Donello JE, Lück R, Steger G, Hope TJ. The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(21):4818–27.
250. Zang WQ, Fieno AM, Grant RA, Yen TS. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *Virology*. 1998;248(1):46–52.

251. Zang WQ, Li B, Huang PY, Lai MM, Yen TS. Role of polypyrimidine tract binding protein in the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *J Virol.* 2001;75(22):10779–86.
252. Heise T, Sommer G, Reumann K, Meyer I, Will H, Schaal H. The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(1):353–63.
253. Locarnini SA, Roggendorf M. Other Hepadnaviridae (Avihepadnaviridae (DHBV) and Orthohepadnaviridae (WHV)). In: Thomas HC, Lok AS, Locarnini SA, Zuckerman AJ, editors. *Viral Hepatitis*. Fourth. Wiley Blackwell; 2013. p. 96–106.
254. Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(9):4533–7.
255. Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol.* 1980;36(3):829–36.
256. Gerlich WH. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virol J. Virology Journal*; 2013;10(1):239.
257. Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol.* Elsevier Ltd; 2013;23(6 Pt B):561–75.
258. He B, Fan Q, Yang F, Hu T, Qiu W, Feng Y, et al. Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(4):638–40.
259. Piasecki T, Kurenbach B, Chrzęstek K, Bednarek K, Kraberger S, Martin DP, et al. Molecular characterisation of an avihepadnavirus isolated from *Psittacula krameri* (ring-necked parrot). *Arch Virol.* 2012;157(3):585–90.
260. Sureau C. The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;307:113–31.
261. Abou-Jaoudé G, Sureau C, Jaoudé GA. Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol.* 2005;79(16):10460–6.
262. Salisse J, Sureau C. A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus “a” determinant. *J Virol.* 2009;83(18):9321–8.
263. 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.
264. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 2008;10(1):122–33.
265. 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.
266. Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology.* Elsevier, Inc; 2014;147(1):48–64.

267. Iozzo R V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609–52.
268. Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M, Schroeder A, Meier PJ. In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology.* 1994;107(6):1781–7.
269. Anwer MS, Stieger B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: More than solute transporters. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology.* 2014. p. 77–89.
270. Yan H, Peng B, He W, Zhong G, Qi Y, Ren B, et al. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol.* 2013;87(14):7977–91.
271. Yan H, Peng B, Liu Y, Xu G, He W, Ren B, et al. Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol.* 2014;88(6):3273–84.
272. Pan W, Song I-S, Shin H-J, Kim M-H, Choi Y-L, Lim S-J, et al. Genetic polymorphisms in Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) and ileal apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) and ethnic comparisons of functional variants of NTCP among Asian populations. *Xenobiotica.* 2011;41(6):501–10.
273. Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB. Ethnicity-dependent polymorphism in Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J Biol Chem.* 2004;279(8):7213–22.
274. Blanchet M, Sureau C. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J Virol.* 2007;81(11):5841–9.
275. Glebe D, Urban S, Knoop E V, Cag N, Krass P, Grün S, et al. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology.* 2005;129(1):234–45.
276. Schulze A, Schieck A, Ni Y, Mier W, Urban S. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *J Virol.* 2010;84(4):1989–2000.
277. Bremer CM, Sominskaya I, Skrastina D, Pumpens P, El Wahed AA, Beutling U, et al. N-terminal myristoylation-dependent masking of neutralizing epitopes in the preS1 attachment site of hepatitis B virus. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver;* 2011;55(1):29–37.
278. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver;* 2010;52(2):282–4.
279. Berting A, Fischer C, Schaefer S, Garten W, Klenk HD, Gerlich WH. Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus Res.* 2000;68(1):35–49.
280. Chernomordik L V., Kozlov MM. Membrane hemifusion: Crossing a chasm in two leaps. *Cell.* 2005;123(3):375–82.

281. Chernomordik L V, Frolov VA, Leikina E, Bronk P, Zimmerberg J. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J Cell Biol.* 1998;140(6):1369–82.
282. Gibbons DL, Vaney M-C, Roussel A, Vigouroux A, Reilly B, Lepault J, et al. Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature.* 2004;427(6972):320–5.
283. Melikyan GB, Barnard RJO, Abrahamyan LG, Mothes W, Young JAT. Imaging individual retroviral fusion events: from hemifusion to pore formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(24):8728–33.
284. Berting A, Hahnen J, Kröger M, Gerlich WH. Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology.* 1995;38(1-2):8–15.
285. Lepère-Douard C, Trotard M, Le Seyec J, Gripon P. The first transmembrane domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. *J Virol.* 2009;83(22):11819–29.
286. Bremer CM, Bung C, Kott N, Hardt M, Glebe D. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbiol.* 2009;11(2):249–60.
287. Kielian M, Rey F a. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(1):67–76.
288. Kann M, Schmitz A, Rabe B. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):39–47.
289. Rabe B, Glebe D, Kann M. Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol.* 2006;80(11):5465–73.
290. Panté N, Kann M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell.* 2002;13(2):425–34.
291. Lim RYH, Aebi U, Stoffler D. From the trap to the basket: getting to the bottom of the nuclear pore complex. *Chromosoma.* 2006;115(1):15–26.
292. Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 2002;158(5):915–27.
293. Zlotnick A, Cheng N, Stahl SJ, Conway JF, Steven AC, Wingfield PT. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(18):9556–61.
294. Rabe B, Vlachou A, Panté N, Helenius A, Kann M. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(17):9849–54.
295. Kobiler O, Drayman N, Butin-Israeli V, Oppenheim A. Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. *Nucleus.* 2012;3(6):526–39.

296. Schmitz A, Schwarz A, Foss M, Zhou L, Rabe B, Hoellenriegel J, et al. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog.* 2010;6(1):e1000741.
297. Rabe B, Delaleau M, Bischof A, Foss M, Sominskaya I, Pumpens P, et al. Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000563.
298. Guidotti L, Matzke B, Schaller H, Chisari F. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol.* 1995;69(10):6158–69.
299. Sohn JA, Litwin S, Seeger C. Mechanism for CCC DNA synthesis in hepadnaviruses. *PLoS One.* 2009;4(11):e8093.
300. Köck J, Baumert TF, Delaney WE, Blum HE, von Weizsäcker F. Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology.* 2003;38(6):1410–8.
301. Delmas J, Schorr O, Jamard C, Gibbs C, Trépo C, Hantz O, et al. Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(2):425–33.
302. Gao W, Hu J. Formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: removal of genome-linked protein. *J Virol.* 2007;81(12):6164–74.
303. Ashour ME, Atteya R, El-Khamisy SF. Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(3):137–51.
304. Pommier Y, Huang SN, Gao R, Das BB, Murai J, Marchand C. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair (Amst).* 2014;19:114–29.
305. Königer C, Wingert I, Marsmann M, Rösler C, Beck J, Nassal M. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(40):E4244–53.
306. Nitiss KC, Malik M, He X, White SW, Nitiss JL. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(24):8953–8.
307. Cui X, McAllister R, Boregowda R, Sohn JA, Ledesma FC, Caldecott KW, et al. Does Tyrosyl DNA Phosphodiesterase-2 Play a Role in Hepatitis B Virus Genome Repair? *PLoS One.* 2015;10(6):e0128401.
308. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015;1–13.
309. Lafrance-Vanasse J, Williams GJ, Tainer J a. Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog Biophys Mol Biol.* Elsevier Ltd; 2015;117(2-3):182–93.

310. Hartsuiker E, Neale MJ, Carr AM. Distinct requirements for the Rad32(Mre11) nuclease and Ctp1(CtIP) in the removal of covalently bound topoisomerase I and II from DNA. *Mol Cell*. 2009;33(1):117–23.
311. Waters CA, Strande NT, Wyatt DW, Pryor JM, Ramsden DA. Nonhomologous end joining: a good solution for bad ends. *DNA Repair (Amst)*. 2014;17:39–51.
312. Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, et al. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest*. 2012;122(2):529–37.
313. Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. *J Infect Dis*. 2009;199(9):1286–91.
314. Zhang Y, Li C, Zhang Y, Zhu H, Kang Y, Liu H, et al. Comparative analysis of CpG islands among HBV genotypes. *PLoS One*. 2013;8(2):e56711.
315. Guo Y, Li Y, Mu S, Zhang J, Yan Z. Evidence that methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in liver tissues of patients with chronic hepatitis B modulates HBV replication. *J Med Virol*. 2009;81(7):1177–83.
316. Laras A, Koskinas J, Dimou E, Kostamena A, Hadziyannis SJ. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology*. 2006;44(3):694–702.
317. Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, Jacob A, Quaas A, Murray JM, et al. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology*. 2007;133(3):843–52.
318. Moriyama K, Hayashida K, Shimada M, Nakano S, Nakashima Y, Fukumaki Y. Antisense RNAs transcribed from the upstream region of the precore/core promoter of hepatitis B virus. *J Gen Virol*. 2003;84(7):1907–13.
319. Wu Y, Zhang W-L, Yang Y, Yu B, Huang A-L. Identification of a novel negative regulatory element on the hepatitis B virus S-(+)-strand. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009;41(10):873–82.
320. Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1415–34.
321. Russnak R, Ganem D. Sequences 5' to the polyadenylation signal mediate differential poly(A) site use in hepatitis B viruses. *Genes Dev*. 1990;4(5):764–76.
322. Nassal M, Junker-Niepmann M, Schaller H. Translational inactivation of RNA function: discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assembly. *Cell*. 1990;63(6):1357–63.
323. Yao E, Schaller H, Tavis JE. The duck hepatitis B virus polymerase and core proteins accumulate in different patterns from their common mRNA. *Virology*. 2003;311(1):81–8.

324. Cao F, Tavis JE. Suppression of mRNA accumulation by the duck hepatitis B virus reverse transcriptase. *Virology*. 2006;350(2):475–83.
325. Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J*. 1992;11(9):3413–20.
326. Nassal M, Rieger A. A bulged region of the hepatitis B virus RNA encapsidation signal contains the replication origin for discontinuous first-strand DNA synthesis. *J Virol*. 1996;70(5):2764–73.
327. Stahl M, Retzlaff M, Nassal M, Beck J. Chaperone activation of the hepadnaviral reverse transcriptase for template RNA binding is established by the Hsp70 and stimulated by the Hsp90 system. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(18):6124–36.
328. Beck J, Nassal M. Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36128–38.
329. Lingappa JR, Martin RL, Wong ML, Ganem D, Welch WJ, Lingappa VR. A eukaryotic cytosolic chaperonin is associated with a high molecular weight intermediate in the assembly of hepatitis B virus capsid, a multimeric particle. *J Cell Biol*. 1994;125(1):99–111.
330. Stray SJ, Ceres P, Zlotnick A. Zinc ions trigger conformational change and oligomerization of hepatitis B virus capsid protein. *Biochemistry*. American Chemical Society; 2004;43(31):9989–98.
331. Porterfield JZ, Dhason MS, Loeb DD, Nassal M, Stray SJ, Zlotnick A. Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity. *J Virol*. 2010;84(14):7174–84.
332. Ning X, Nguyen D, Mentzer L, Adams C, Lee H, Ashley R, et al. Secretion of genome-free hepatitis B virus--single strand blocking model for virion morphogenesis of para-retrovirus. *PLoS Pathog*. Public Library of Science; 2011;7(9):e1002255.
333. Chen C, Wang JC-Y, Zlotnick A. A kinase chaperones hepatitis B virus capsid assembly and captures capsid dynamics in vitro. *PLoS Pathog*. 2011;7(11):e1002388.
334. Tang H, McLachlan A. A Pregenomic RNA Sequence Adjacent to DR1 and Complementary to Epsilon Influences Hepatitis B Virus Replication Efficiency. *Virology*. 2002;303(1):199–210.
335. Abraham TM, Loeb DD. The topology of hepatitis B virus pregenomic RNA promotes its replication. *J Virol*. 2007;81(21):11577–84.
336. Haines KM, Loeb DD. The sequence of the RNA primer and the DNA template influence the initiation of plus-strand DNA synthesis in hepatitis B virus. *J Mol Biol*. 2007;370(3):471–80.
337. Staprans S, Loeb DD, Ganem D. Mutations affecting hepadnavirus plus-strand DNA synthesis dissociate primer cleavage from translocation and reveal the origin of linear viral DNA. *J Virol*. 1991;65(3):1255–62.

338. Liu N, Tian R, Loeb DD. Base pairing among three cis-acting sequences contributes to template switching during hepadnavirus reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1984–9.
339. Le Pogam S, Chua PK, Newman M, Shih C. Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173). *J Virol*. 2005;79(3):1871–87.
340. Bardens A, Döring T, Stieler J, Prange R. Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner. *Cell Microbiol*. 2011;13(4):602–19.
341. Dryden K a., Wieland SF, Whitten-Bauer C, Gerin JL, Chisari F V., Yeager M. Native Hepatitis B Virions and Capsids Visualized by Electron Cryomicroscopy. *Mol Cell*. 2006;22(6):843–50.
342. Yuan TT, Sahu GK, Whitehead WE, Greenberg R, Shih C. The mechanism of an immature secretion phenotype of a highly frequent naturally occurring missense mutation at codon 97 of human hepatitis B virus core antigen. *J Virol*. 1999;73(7):5731–40.
343. Ponsel D, Bruss V. Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J Virol*. 2003;77(1):416–22.
344. Löffler-Mary H, Dumortier J, Klentsch-Zimmer C, Prange R. Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology*. 2000;270(2):358–67.
345. Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(3):1059–63.
346. Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(24):10205–10.
347. Lambert C, Döring T, Prange R. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol*. 2007;81(17):9050–60.
348. Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(8):556–66.
349. Rost M, Mann S, Lambert C, Döring T, Thomé N, Prange R. Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J Biol Chem*. 2006;281(39):29297–308.
350. Wong DK-H, Yuen M-F, Yuan H, Sum SS-M, Hui C-K, Hall J, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology*. 2004;40(3):727–37.
351. Dandri M, Burda MR, Will H, Petersen J. Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA. *Hepatology*. 2000;32(1):139–46.

352. Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS. Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol.* 1997;71(12):9392–9.
353. Lutgehetmann M, Volz T, Köpke A, Broja T, Tigges E, Lohse AW, et al. In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatology.* 2010;52(1):16–24.
354. Summers J, Smith PM, Horwich AL. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol.* 1990;64(6):2819–24.
355. Summers J, Smith PM, Huang MJ, Yu MS. Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus. *J Virol.* 1991;65(3):1310–7.
356. Nesser NK, Peterson DO, Hawley DK. RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(9):3268–73.
357. Park SG, Kim Y, Park E, Ryu HM, Jung G. Fidelity of hepatitis B virus polymerase. *Eur J Biochem.* 2003;270(14):2929–36.
358. Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med.* 1987;57(4):231–6.
359. Fares MA, Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol.* 2002;54(6):807–14.
360. Osiowy C, Giles E, Tanaka Y, Mizokami M, Minuk GY. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *J Virol.* 2006;80(21):10307–14.
361. Duffy S, Shackelton L a, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet.* 2008;9(4):267–76.
362. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hillt AM, Boehmet R, Thomas HC, Mcdadet H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(9):4398–402.
363. Zeuzem S, de Man RA, Honkoop P, Roth WK, Schalm SW, Schmidt JM. Dynamics of hepatitis B virus infection in vivo. *J Hepatol.* 1997;27(3):431–6.
364. Ngui SL, Hallet R, Teo CG. Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Rev Med Virol.* 1999;9(3):183–209.
365. Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet.* 1993;341(8841):349–53.
366. Eigen M, Schuster P. *The Hypercycle.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1979.
367. Domingo E, Flavell RA, Weissmann C. In vitro site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Qbeta. *Gene.* 1976;1(1):3–25.

368. Batschelet E, Domingo E, Weissmann C. The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene*. 1976;1(1):27–32.
369. Domingo E, Sabo D, Taniguchi T, Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell*. 1978;13(4):735–44.
370. Domingo E, Baranowski E, Nuñez J. Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 2000;19(1):55–63.
371. Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, Fujimoto Y, Imamura M, Takahashi S, et al. G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology*. 2005;41(3):626–33.
372. Cullen BR. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol*. 2006;80(3):1067–76.
373. Schories M, Peters T, Rasenack J. Isolation, characterization and biological significance of hepatitis B virus mutants from serum of a patient with immunologically negative HBV infection. *J Hepatol*. 2000;33(5):799–811.
374. Preikschat P, Günther S, Reinhold S, Will H, Budde K, Neumayer HH, et al. Complex HBV populations with mutations in core promoter, C gene, and pre-S region are associated with development of cirrhosis in long-term renal transplant recipients. *Hepatology*. 2002;35(2):466–77.
375. Preikschat P, Meisel H, Will H, Günther S. Hepatitis B virus genomes from long-term immunosuppressed virus carriers are modified by specific mutations in several regions. *J Gen Virol*. 1999;80 (Pt 10):2685–91.
376. Günther S, Piwon N, Iwanska A, Schilling R, Meisel H, Will H. Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J Virol*. 1996;70(12):8318–31.
377. Belnap DM, Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Wingfield PT, et al. Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):10884–9.
378. Alexopoulou a, Karayiannis P, Hadziyannis SJ, Hou J, Pickering J, Luo K, et al. Whole genome analysis of hepatitis B virus from four cases of fulminant hepatitis: genetic variability and its potential role in disease pathogenicity. *J Viral Hepat*. 1996;3(4):173–81.
379. Liu F, Chen L, Yu D-M, Deng L, Chen R, Jiang Y, et al. Evolutionary patterns of hepatitis B virus quasispecies under different selective pressures: correlation with antiviral efficacy. *Gut*. 2011;60(9):1269–77.
380. Chen L, Zhang Q, Yu D, Wan M, Zhang X. Early changes of hepatitis B virus quasispecies during lamivudine treatment and the correlation with antiviral efficacy. *J Hepatol*. European Association for the Study of the Liver; 2009;50(5):895–905.
381. Lim S, Cheng Y, Guindon S, Seet B, Lee L. Viral quasi-species evolution during hepatitis Be antigen seroconversion. *Gastroenterology*. 2007;133(3):951–8.

382. Cheng Y, Guindon S, Rodrigo A, Wee LY, Inoue M, Thompson AJ V, et al. Cumulative viral evolutionary changes in chronic hepatitis B virus infection precedes hepatitis B e antigen seroconversion. *Gut*. 2013;62(9):1347–55.
383. Gregori J, Salicrú M, Domingo E, Sanchez A, Esteban JI, Rodríguez-Frías F, et al. Inference with viral quasispecies diversity indices: Clonal and NGS approaches. *Bioinformatics*. 2014;30(8):1104–11.
384. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(2):159–216.
385. Shannon C. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J*. 1948;27:379–423.
386. Ramírez C, Gregori J, Buti M, Tabernero D, Camós S, Casillas R, et al. A comparative study of ultra-deep pyrosequencing and cloning to quantitatively analyze the viral quasispecies using hepatitis B virus infection as a model. *Antiviral Res*. 2013;98(2):273–83.
387. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*. 1988;69 (Pt 10):2575–83.
388. Norder H, Couroucé A-M, Coursaget P, Echevarria J-M, Lee S-D, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47(6):289–309.
389. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7152–68.
390. Shi W, Carr MJ, Dunford L, Zhu C, Hall WW, Higgins DG. Identification of novel inter-genotypic recombinants of human hepatitis B viruses by large-scale phylogenetic analysis. *Virology*. Elsevier Inc.; 2012;427(1):51–9.
391. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D36–42.
392. Sakamoto T, Tanaka Y, Simonetti J, Osiowy C, Borresen ML, Koch A, et al. Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic indigenous populations. *J Infect Dis*. 2007;196(10):1487–92.
393. Mahgoub S, Candotti D, El Ekiaby M, Allain JP. Hepatitis B virus (HBV) infection and recombination between HBV genotypes D and E in asymptomatic blood donors from Khartoum, Sudan. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):298–306.
394. Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: Comparison of genotyping methods. *Reviews in Medical Virology*. 2004. p. 3–16.
395. Hardie DR, Williamson C. Analysis of the preS1 gene of hepatitis B virus (HBV) to define epidemiologically linked and un-linked infections in South Africa. *Arch Virol*. 1997;142(9):1829–41.

396. Rodríguez-Frías F, Jardí R, Buti M, Schaper M, Hermosilla E, Valdes A, et al. Hepatitis B virus genotypes and G1896A precore mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. *J Viral Hepat.* 2006;13(5):343–50.
397. Zhang Q, Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma: HBV properties and hepatocarcinogenesis. *Hepat Mon.* Kowsar; 2011;11(2):86–91.
398. Araujo NM, Waizbort R, Kay A. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infect Genet Evol.* Elsevier B.V.; 2011;11(6):1199–207.
399. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* 2000;81(1):67–74.
400. Günther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res.* 1999;52:25–137.
401. Rodríguez-Frías F, Buti M, Jardí R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, et al. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology.* 1995;22(6):1641–7.
402. Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 2005;12(5):456–64.
403. Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, Ichida T, Komatsu M, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. *J Med Virol.* 2003;70(4):537–44.
404. Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, et al. Hepatitis B virus subgenotyping: History, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infection, Genetics and Evolution.* 2013. p. 355–61.
405. Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SYW, Belshaw R, Allain JP, et al. Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology.* 2013;57(3):908–16.
406. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology.* 2002;123(6):1848–56.
407. Shi Y-H. Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(6):476–82.
408. Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang J-H, Hige S, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2006;44(2):326–34.
409. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2000;118(3):554–9.

410. Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology*. 2001;34(3):590–4.
411. Erhardt a, Blondin D, Hauck K, Sagir a, Kohnle T, Heintges T, et al. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut*. 2005;54(7):1009–13.
412. Buster EHCJ, Flink HJ, Cakaloglu Y, Simon K, Trojan J, Tabak F, et al. Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. *Gastroenterology*. 2008;135(2):459–67.
413. Heijtkink RA, van Bergen P, van Roosmalen MH, Sünnen CM, Paulij WP, Schalm SW, et al. Anti-HBs after hepatitis B immunization with plasma-derived and recombinant DNA-derived vaccines: binding to mutant HBsAg. *Vaccine*. 2001;19(27):3671–80.
414. Tacke F, Amini-Bavil-Olyae S, Heim A, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Acute hepatitis B virus infection by genotype F despite successful vaccination in an immune-competent German patient. *J Clin Virol*. 2007;38(4):353–7.
415. Olinger CM, Weber B, Otegbayo JA, Ammerlaan W, van der Taelen-Brulé N, Muller CP. Hepatitis B virus genotype E surface antigen detection with different immunoassays and diagnostic impact of mutations in the preS/S gene. *Med Microbiol Immunol*. 2007;196(4):247–52.
416. Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai 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(3):1298–303.
417. Song B-C, Cui XJ, Kim HU, Cho Y-K. Sequential accumulation of the basal core promoter and the precore mutations in the progression of hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Intervirology*. 2006;49(5):266–73.
418. Mphahlele MJ, Shattock a G, Boner W, Quinn J, McCormick P a, Carman WF. Transmission of a homogenous hepatitis B virus population of A1896-containing strains leading to mild resolving acute hepatitis and seroconversion to hepatitis B e antigen antibodies in an adult. *Hepatology*. 1997;26(3):743–6.
419. Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Valdes A, Allende H, et al. Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *J Hepatol*. 2004;40(3):507–14.
420. Kim D-W, Lee S-A, Hwang E-S, Kook Y-H, Kim B-J. Naturally occurring precore/core region mutations of hepatitis B virus genotype C related to hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(10):e47372.
421. Sanchez MJ, Buti M, Homs M, Palacios A, Rodríguez-Frías F, Esteban R. Successful use of entecavir for a severe case of reactivation of hepatitis B virus following polychemotherapy containing rituximab. *J Hepatol*. 2009;51(6):1091–6.
422. Salfeld J, Pfaff E, Noah M, Schaller H. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J Virol*. 1989;63(2):798–808.

423. Homs M, Jardi R, Buti M, Schaper M, Tabernero D, Fernandez-Fernandez P, et al. HBV core region variability: effect of antiviral treatments on main epitopic regions. *Antivir Ther.* 2011;16(1):37–49.
424. Homs M, Buti M, Tabernero D, Quer J, Sanchez A, Corral N, et al. Quasispecies dynamics in main core epitopes of hepatitis B virus by ultra-deep-pyrosequencing. *World J Gastroenterol.* 2012;18(42):6096–105.
425. Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH, Buckwold VE, et al. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol.* 1996;70(9):5845–51.
426. Zhang D, Ma S, Zhang X, Zhao H, Ding H, Zeng C. Prevalent HBV point mutations and mutation combinations at BCP/preC region and their association with liver disease progression. *BMC Infect Dis.* 2010;10:271.
427. Xiao L, Zhou B, Gao H, Ma S, Yang G, Xu M, et al. Hepatitis B virus genotype B with G1896A and A1762T/G1764A mutations is associated with hepatitis B related acute-on-chronic liver failure. *J Med Virol.* 2011;83(9):1544–50.
428. Lee J-H, Han K-H, Lee JM, Park JH, Kim H-S. Impact of hepatitis B virus (HBV) x gene mutations on hepatocellular carcinoma development in chronic HBV infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(6):914–21.
429. Kwon HK, Lok AS. Treatment of hepatitis B. In: Thomas HC, Lok AS, Locarnini SA, Zuckerman AJ, editors. *Viral Hepatitis*. Fourth. Wiley Blackwell; 2013. p. 188–202.
430. Zoulim F, Locarnini SA. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology.* Elsevier Inc.; 2009;137(5):1593–608.
431. Wang HC, Huang W, Lai M-D, Su I-J. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.* 2006;97(8):683–8.
432. Kao J-H, Liu C-J, Jow G-M, Chen P-J, Chen D-S, Chen B-F. Fine mapping of hepatitis B virus pre-S deletion and its association with hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2012;32(9):1373–81.
433. Katz LH, Paul M, Guy DG, Tur-Kaspa R. Prevention of recurrent hepatitis B virus infection after liver transplantation: hepatitis B immunoglobulin, antiviral drugs, or both? Systematic review and meta-analysis. *Transpl Infect Dis.* 2010;12(4):292–308.
434. Samuel D, Muller R, Alexander G, Fassati L, Ducot B, Benhamou JP, et al. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med.* 1993;329(25):1842–7.
435. Louisirirothanakul S, Khupulsup K, Akraekthalin S, Chan KP, Saw S, Aw TC, et al. Comparison of the technical and clinical performance of the Elecsys HBsAg II assay with the Architect, AxSym, and Advia Centaur HBsAg screening assays. *J Med Virol.* 2010;82(5):755–62.
436. Khedive a, Norouzi M, Ramezani F, Karimzadeh H, Alavian SM, Malekzadeh R, et al. Hepatitis B virus surface protein mutations clustered mainly in CTL immune epitopes in

- chronic carriers: results of an Iranian nationwide study. *J Viral Hepat.* 2013;20(7):494–501.
437. Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgton K, Zhuang H, Locarnini SA, et al. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology.* 2002;293(2):305–13.
438. Warner N, Locarnini SA. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. *Hepatology.* 2008;48(1):88–98.
439. Amini-Bavil-Olyae S, Sheldon J, Lutz T, Trautwein C, Tacke F. Molecular analysis of an HBsAg-negative hepatitis B virus mutant selected in a tenofovir-treated HIV-hepatitis B virus co-infected patient. *AIDS.* 2009;23(2):268–72.
440. Lai M, Huang S, Hsu C, Chang M, Liaw Y, Yeh C. Identification of nonsense mutations in hepatitis B virus S gene in patients with hepatocellular carcinoma developed after lamivudine therapy. *Antivir Ther.* 2009;14(2):249–61.
441. Jiang SS, Huang S-F, Huang M-S, Chen Y-T, Jhong H-J, Chang I-C, et al. Dysregulation of the TGFBI gene is involved in the oncogenic activity of the nonsense mutation of hepatitis B virus surface gene sW182*. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(7):1080–7.
442. Yeh C-T, Chen T, Hsu C-W, Chen Y-C, Lai M-W, Liang K-H, et al. Emergence of the rtA181T/sW172* mutant increased the risk of hepatoma occurrence in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *BMC Cancer.* BioMed Central Ltd; 2011;11(1):398.
443. Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 1:144–52.
444. Liu XH, Lin J, Zhang SH, Zhang SM, Feitelson M a., Gao HJ, et al. COOH-terminal deletion of HBx gene is a frequent event in HBV-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008;14(9):1346–52.
445. Jardi R, Rodríguez-Frías F, Schaper M, Giggi E, Taberner D, Homs M, et al. Analysis of hepatitis B genotype changes in chronic hepatitis B infection: Influence of antiviral therapy. *J Hepatol.* European Association for the Study of the Liver; 2008;49(5):695–701.
446. Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):702–7.
447. Jardi R, Buti M, Rodríguez-Frías F, Cotrina M, Costa X, Pascual C, et al. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods.* 1999;83(1-2):181–7.
448. Hannachi N, Fredj N Ben, Bahri O, Thibault V, Ferjani A, Gharbi J, et al. Molecular analysis of HBV genotypes and subgenotypes in the Central-East region of Tunisia. *Virol J.* 2010;7:302.

449. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology*. 1998;27(6):1711–6.
450. Cane PA, Cook P, Ratcliffe D, Mutimer D, Pillay D. Use of real-time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(7):1600–8.
451. Wang R-S, Zhang H, Zhu Y-F, Han B, Yang Z-J. Detection of YMDD mutants using universal template real-time PCR. *World J Gastroenterol*. 2006;12(8):1308–11.
452. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463–7.
453. Stranneheim H, Lundeberg J. Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnol J*. 2012;7(9):1063–73.
454. Voelkerding K, Dames S, Durtschi J. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*. 2009;55(4):641–58.
455. Reuter JA, Spacek D V., Snyder MP. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell*. Elsevier Inc.; 2015;58(4):586–97.
456. Kim H-S, Han K-H, Ahn SH, Kim E-O, Chang H-Y, Moon MS, et al. Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization. *Antivir Ther*. 2005;10(3):441–9.
457. Hussain M, Fung S, Libbrecht E, Sablon E, Cursaro C, Andreone P, et al. Sensitive line probe assay that simultaneously detects mutations conveying resistance to lamivudine and adefovir. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):1094–7.
458. Gauthier M, Bonnaud B, Arsac M, Lavocat F, Maisetti J, Kay A, et al. Microarray for hepatitis B virus genotyping and detection of 994 mutations along the genome. *J Clin Microbiol*. 2010;48(11):4207–15.
459. Zoulim F, Locarnini S. Management of treatment failure in chronic hepatitis B. *J Hepatol*. European Association for the Study of the Liver; 2012;56(SUPPL. 1):S112–22.
460. Jardi R, Rodríguez-Frías F, Tabernero D, Homs M, Schaper M, Esteban R, et al. Use of the novel INNO-LiPA line probe assay for detection of hepatitis B virus variants that confer resistance to entecavir therapy. *J Clin Microbiol*. 2009;47(2):485–8.
461. Lok AS, Zoulim F, Locarnini SA, Mangia A, Niro G, Decraemer H, et al. Monitoring Drug Resistance in Chronic Hepatitis B Virus (HBV)-Infected Patients during Lamivudine Therapy: Evaluation of Performance of INNO-LiPA HBV DR Assay. *J Clin Microbiol*. American Society for Microbiology; 2002;40(10):3729–34.
462. Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok AS. Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3699–705.

463. Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ, Hood LE. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(7):2399–412.
464. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986;321(6071):674–9.
465. Kircher M, Kelso J. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays.* 2010;32(6):524–36.
466. Datta S. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. *World J Virol.* 2015;4(3):265.
467. Quiñones-Mateu ME, Avila S, Reyes-Teran G, Martinez M a. Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology. *J Clin Virol. Elsevier B.V.;* 2014;61(1):9–19.
468. Loman NJ, Misra R V, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol.* 2012;30(5):434–9.
469. Beerenwinkel N, Zagordi O. Ultra-deep sequencing for the analysis of viral populations. *Curr Opin Virol. Elsevier B.V.;* 2011;1(5):413–8.
470. Zagordi O, Klein R, Däumer M, Beerenwinkel N. Error correction of next-generation sequencing data and reliable estimation of HIV quasispecies. *Nucleic Acids Res. Oxford Univ Press;* 2010;38(21):7400–9.
471. Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 9):1853–68.
472. Buermans HPI, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta. Elsevier B.V.;* 2014;1842(10):In Press.
473. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembem LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high density picoliter reactors. *Nature. NIH Public Access;* 2005;437(7057):376–80.
474. 454 Life Sciences. Signal Processing. In: 454 Sequencing System Software Manual Version 29, Part B: GS Run Processor, GS Reporter, GS Run Browser, GS Support Tool. 2013. p. 14–33.
475. Ott JJ, Stevens G a., Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine. Elsevier Ltd;* 2012;30(12):2212–9.
476. Easterbrook P, editor. Background. In: Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis b infection. March 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 10–24.

477. Zoulim F. Hepatitis B infections - Implications for public health. In: Brancour V, editor. *Virology of Hepatitis B*. 1st ed. Issy-les-Moulineaux cedex: Elsevier-Masson SAS; 2006. p. 9–20.
478. World Health Organization. Hepatitis B vaccines. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009;84(40):405–20.
479. Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol*. 2005;34(6):1329–39.
480. Salleras L, Domínguez A, Bruguera M, Plans P, Costa J, Cardeñosa N, et al. Declining prevalence of hepatitis B virus infection in Catalonia (Spain) 12 years after the introduction of universal vaccination. *Vaccine*. 2007;25(52):8726–31.
481. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095–128.
482. Trépo C, Chan HLY, Lok AS. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014;6736(14):1–11.
483. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;11(2):97–107.
484. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. European Association for the Study of the Liver; 2012;57(1):167–85.
485. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007;45(2):507–39.
486. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004;350(11):1118–29.
487. Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis*. 2003;23(1):47–58.
488. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis G V. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: Natural history and treatment. *Semin Liver Dis*. 2006;26(2):130–41.
489. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. In: *Seminars in Liver Disease*. 2004. p. 17–21.
490. Fattovich G, Olivari N, Pasino M, D'Onofrio M, Martone E, Donato F. Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years. *Gut*. 2008;57(1):84–90.
491. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*. 2008;48(2):335–52.
492. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S35–50.

493. Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: Summary of a clinical research workshop. *Hepatology*. 2007. p. 1056–75.
494. Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, Akremi R, Pham B-N, Ollivier S, et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *J Hepatol*. 2002;36(4):543–6.
495. Papatheodoridis G V, Manesis EK, Manolakopoulos S, Elefsiniotis IS, Goulis J, Giannousis J, et al. Is there a meaningful serum hepatitis B virus DNA cutoff level for therapeutic decisions in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B virus infection? *Hepatology*. 2008;48(5):1451–9.
496. Chen Y-C, Huang S-F, Chu C-M, Liaw Y-F. Serial HBV DNA levels in patients with persistently normal transaminase over 10 years following spontaneous HBeAg seroconversion. *J Viral Hepat*. 2012;19(2):138–46.
497. De Franchis R, Meucci G, Vecchi M, Tatarella M, Colombo M, Del Ninno E, et al. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med*. 1993;118(3):191–4.
498. Papatheodoridis G V, Chrysanthos N, Hadziyannis E, Cholongitas E, Manesis EK. Longitudinal changes in serum HBV DNA levels and predictors of progression during the natural course of HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*. 2008;15(6):434–41.
499. Buti M, García-Samaniego J, Prieto M, Rodríguez M, Sánchez-Tapias JM, Suárez E, et al. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B (2012). *Gastroenterol Hepatol. SEGO*; 2012;35(7):512–28.
500. Brunetto MR, Giarin M, Oliveri F, Saracco G, Barbera C, Parrella T, et al. “e” antigen defective hepatitis B virus and course of chronic infection. *J Hepatol*. 1991;13 Suppl 4:S82–6.
501. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia M-A, Chen D-S, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2008;49(4):652–7.
502. Chen Y-C, Sheen I-S, Chu C-M, Liaw Y-F. Prognosis following spontaneous HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients with or without concurrent infection. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1084–9.
503. Knöll A, Pietrzyk M, Loss M, Goetz WA, Jilg W. Solid-organ transplantation in HBsAg-negative patients with antibodies to HBV core antigen: low risk of HBV reactivation. *Transplantation*. 2005;79(11):1631–3.
504. Chen C-J, Yang H-I. Natural history of chronic hepatitis B REVEALed. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(4):628–38.
505. Mommeja-Marin H, Mondou E, Blum MR, Rousseau F. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature. *Hepatology*. 2003;37(6):1309–19.

506. Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S, Grare M, Pawlotsky J-M. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: finite treatment duration unlikely. *J Hepatol.* 2013;58(4):676–83.
507. Lampertico P, Viganò M, Cheroni C, Facchetti F, Invernizzi F, Valveri V, et al. IL28B polymorphisms predict interferon-related hepatitis B surface antigen seroclearance in genotype D hepatitis B e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2013;57(3):890–6.
508. Allweiss L, Volz T, Lütgehetmann M, Giersch K, Bornscheuer T, Lohse AW, et al. Immune cell responses are not required to induce substantial hepatitis B virus antigen decline during pegylated interferon-alpha administration. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver;* 2014;60(3):500–7.
509. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau GK, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology.* 2004;126(7):1750–8.
510. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science.* 2014;343:1221–8.
511. Santantonio TA, Fasano M. Chronic hepatitis B: Advances in treatment. *World J Hepatol.* 2014;6(5):284–92.
512. Haleboua-De Marzio D, Hann H-W. Then and now: the progress in hepatitis B treatment over the past 20 years. *World J Gastroenterol.* 2014;20(2):401–13.
513. Lau GKK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, et al. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 2005;352(26):2682–95.
514. Piratvisuth T, Marcellin P, Brunetto M, Bonino F, Farci P, Yurdaydin C, et al. Sustained Immune Control 1 Year Post-Treatment With Peginterferon Alfa-2a [40KD] (Pegasys) is Durable up to 5 Years Post-Treatment and is Associated With a High Rate of HBsAg Clearance in HBeAg- Negative Chronic Hepatitis B. *Hepatol Int.* 2010;4:Abstract 210.
515. Van Zonneveld M, Flink HJ, Verhey E, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, et al. The safety of pegylated interferon alpha-2b in the treatment of chronic hepatitis B: predictive factors for dose reduction and treatment discontinuation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21(9):1163–71.
516. Zoulim F, Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. *J Hepatol.* 2008;48 Suppl 1:S2–19.
517. Boglione L, D'Avolio A, Cariti G, Gregori G, Burdino E, Baietto L, et al. Kinetics and prediction of HBsAg loss during therapy with analogues in patients affected by chronic hepatitis B HBeAg negative and genotype D. *Liver Int.* 2013;33(4):580–5.
518. Carrouée-Durantel S, Durantel D, Werle-Lapostolle B, Pichoud C, Naesens L, Neyts J, et al. Suboptimal response to adefovir dipivoxil therapy for chronic hepatitis B in nucleoside-naïve patients is not due to pre-existing drug-resistant mutants. *Antivir Ther.* 2008;13(3):381–8.

519. Mutimer D. Tenofovir salvage for nucleoside experienced patients: muddy waters? *Gut*. 2011;60(2):148–50.
520. Pichoud C, Seignères B, Wang Z, Trépo C, Zoulim F. Transient selection of a hepatitis B virus polymerase gene mutant associated with a decreased replication capacity and famciclovir resistance. *Hepatology*. 1999;29(1):230–7.
521. Yeh CT, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*. 2000;31(6):1318–26.
522. Amini-Bavil-Olyaei S, Herbers U, Sheldon J, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology*. 2009;49(4):1158–65.
523. Torresi J, Earnest-Silveira L, Civitico G, Walters TE, Lewin SR, Fyfe J, et al. Restoration of Replication Phenotype of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Mutants by Compensatory Changes in the “Fingers” Subdomain of the Viral Polymerase Selected as a Consequence of Mutations in the Overlapping S Gene. *Virology*. 2002;299(1):88–99.
524. Delaney WE, Yang H, Westland CE, Das K, Arnold E, Gibbs CS, et al. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol*. 2003;77(21):11833–41.
525. Fu L, Cheng YC. Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L(-)SddC (3TC) resistance. *Biochem Pharmacol*. 1998;55(10):1567–72.
526. Sheldon J, Camino N, Rodés B, Bartholomeusz A, Kuiper M, Tacke F, et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir Ther*. 2005;10(6):727–34.
527. Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology*. 1999;30(2):567–72.
528. Warner N, Locarnini S. Mechanisms of hepatitis B virus resistance development. *Intervirology*. 2014;57(3-4):218–24.
529. Reijnders JGP, Deterding K, Petersen J, Zoulim F, Santantonio T, Buti M, et al. Antiviral effect of entecavir in chronic hepatitis B: influence of prior exposure to nucleos(t)ide analogues. *J Hepatol*. European Association for the Study of the Liver; 2010;52(4):493–500.
530. Easterbrook P, editor. Implementation considerations for National Programmes. In: *Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection*. March 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 108–13.
531. Leung N. Treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B with nucleos(t)ide analogues. *Liver Int*. 2011;31(SUPPL. 1):85–9.

532. Papatheodoridis G V. Treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B patients with nucleos(t)ide analogues. *Liver Int.* 2011;31(SUPPL. 1):95–103.
533. Lai C-L, Gane E, Liaw Y-F, Hsu C-W, Thongsawat S, Wang Y, et al. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 2007;357(25):2576–88.
534. Liaw Y-F, Gane E, Leung N, Zeuzem S, Wang Y, Lai CL, et al. 2-Year GLOBE trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2009;136(2):486–95.
535. Lee K, Chu CK. Molecular modeling approach to understanding the mode of action of L-nucleosides as antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(1):138–44.
536. Delaney WE, Locarnini S, Shaw T. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: Current aspects and directions for future investigation. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy.* 2001. p. 1–35.
537. Ghany MG, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2007;132(4):1574–85.
538. Villet S, Pichoud C, Billioud G, Barraud L, Durantel S, Trépo C, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J Hepatol.* 2008;48(5):747–55.
539. Rodríguez-Frías F, Jardi R. Virología molecular del virus de la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(Suppl 7):2–10.
540. Chang T-T, Lai C-L, Kew Yoon S, Lee SS, Coelho HSM, Carrilho FJ, et al. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2010;51(2):422–30.
541. Innaimo SF, Seifer M, Bisacchi GS, Standring DN, Zahler R, Colonno RJ. Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother. Am Soc Microbiol;* 1997;41(7):1444.
542. Tenney D, Levine S, Rose R, Walsh A, Weinheimer S, Discotto L, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother. Am Soc Microbiol;* 2004;48(9):3498–507.
543. Schirmbeck R, Böhm W, Fissolo N, Melber K, Reimann J. Different immunogenicity of H-2 Kb-restricted epitopes in natural variants of the hepatitis B surface antigen. *Eur J Immunol.* 2003;33(9):2429–38.
544. Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 2008;359(23):2442–55.
545. Patterson SJ, George J, Strasser SI, Lee a U, Sievert W, Nicoll a J, et al. Tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy following failure of both lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B. *Gut.* 2011;60(2):247–54.

546. Villet S, Ollivet A, Pichoud C, Barraud L, Villeneuve J-PP, Trépo C, et al. Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient. *J Hepatol.* 2007;46(3):531–8.
547. Qi X, Xiong S, Yang H, Miller M, Delaney WE. In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. *Antivir Ther.* 2007;12(3):355–62.
548. Cholongitas E, Papatheodoridis G V. Review of the pharmacological management of hepatitis B viral infection before and after liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2013;19(48):9189–97.
549. Rosenau J, Bahr MJ, Tillmann HL, Trautwein C, Klempnauer J, Manns MP, et al. Lamivudine and low-dose hepatitis B immune globulin for prophylaxis of hepatitis B reinfection after liver transplantation possible role of mutations in the YMDD motif prior to transplantation as a risk factor for reinfection. *J Hepatol.* 2001;34(6):895–902.
550. Fontana RJ, Hann H-WL, Perrillo RP, Vierling JM, Wright T, Rakela J, et al. Determinants of early mortality in patients with decompensated chronic hepatitis B treated with antiviral therapy. *Gastroenterology.* 2002;123(3):719–27.
551. Zoulim F, Radenne S, Ducerf C. Management of patients with decompensated hepatitis B virus associated [corrected] cirrhosis. *Liver Transpl.* 2008;14 Suppl 2:S1–7.
552. Papatheodoridis G V, Cholongitas E, Archimandritis AJ, Burroughs AK. Current management of hepatitis B virus infection before and after liver transplantation. *Liver Int.* 2009;29(9):1294–305.
553. Pipili CL, Papatheodoridis G V, Cholongitas EC. Treatment of hepatitis B in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013;84(5):880–5.
554. Ciesek S, Helfritz F a, Lehmann U, Becker T, Strassburg CP, Neipp M, et al. Persistence of occult hepatitis B after removal of the hepatitis B virus-infected liver. *J Infect Dis.* 2008;197(3):355–60.
555. Pontisso P, Vidalino L, Quarta S, Gatta A. Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells. *Autoimmun Rev.* 2008;8(1):13–7.
556. O’Grady JG, Smith HM, Davies SE, Daniels HM, Donaldson PT, Tan KC, et al. Hepatitis B virus reinfection after orthotopic liver transplantation. Serological and clinical implications. *J Hepatol.* 1992;14(1):104–11.
557. Lake JR, Wright TL. Liver transplantation for patients with hepatitis B: what have we learned from our results? *Hepatology.* 1991;13(4):796–9.
558. Todo S, Demetris AJ, Van Thiel D, Teperman L, Fung JJ, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation for patients with hepatitis B virus-related liver disease. *Hepatology.* 1991;13(4):619–26.
559. Shouval D, Samuel D. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation: a concise review. *Hepatology.* 2000;32(6):1189–95.

560. Fox AN, Terrault NA. The option of HBIG-free prophylaxis against recurrent HBV. *J Hepatol.* 2012;56(5):1189–97.
561. Loomba R, Rowley AK, Wesley R, Smith KG, Liang TJ, Pucino F, et al. Hepatitis B immunoglobulin and Lamivudine improve hepatitis B-related outcomes after liver transplantation: meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(6):696–700.
562. Cholongitas E, Papatheodoridis G V. High genetic barrier nucleos(t)ide analogue(s) for prophylaxis from hepatitis B virus recurrence after liver transplantation: a systematic review. *Am J Transplant.* 2013;13(2):353–62.
563. Mutimer D, Dusheiko G, Barrett C, Grellier L, Ahmed M, Anschuetz G, et al. Lamivudine without HBIG for prevention of graft reinfection by hepatitis B: long-term follow-up. *Transplantation.* 2000;70(5):809–15.
564. Chan HL-Y, Chui AK-K, Lau W-Y, Chan FK-L, Hui AY, Rao ARN, et al. Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus mutant post-liver transplantation on lamivudine monoprohylaxis. *Clin Transplant.* 2004;18(3):295–300.
565. Zheng S, Chen Y, Liang T, Lu A, Wang W, Shen Y, et al. Prevention of hepatitis B recurrence after liver transplantation using lamivudine or lamivudine combined with hepatitis B Immunoglobulin prophylaxis. *Liver Transpl.* 2006;12(2):253–8.
566. Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, Sureau C, Beck J, Levrero M, et al. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions--report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut.* 2015;9:1314–26.
567. Feld JJ, Colledge D, Sozzi V, Edwards R, Littlejohn M, Locarnini SA. The phenylpropenamide derivative AT-130 blocks HBV replication at the level of viral RNA packaging. *Antiviral Res.* 2007;76(2):168–77.
568. Stray SJ, Bourne CR, Punna S, Lewis WG, Finn MG, Zlotnick A. A heteroaryldihydropyrimidine activates and can misdirect hepatitis B virus capsid assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(23):8138–43.
569. Wu G-Y, Zheng X-J, Yin C-C, Jiang D, Zhu L, Liu Y, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by Bay 41-4109 and its association with nucleocapsid disassembly. *J Chemother.* 2008;20(4):458–67.
570. Belloni L, Li L, Palumbo G, Levrero M. HAPs hepatitis B virus (HBV) capsid inhibitors block core protein interaction with the viral minichromosome and host cell genes and affect cccDNA transcription and stability. *Hepatology.* 2013;(277A).
571. Cai D, Mills C, Yu W, Yan R, Aldrich CE, Saputelli JR, et al. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(8):4277–88.
572. Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther.* 2010;18(5):947–54.

573. Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbuthnot P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther.* 2013;21(10):1889–97.
574. Belloni L, Palumbo G, Valente S, Levrero M. Mimicking Interferon- α (IFN α) inhibitory activity on hepatitis B virus (HBV) transcription and replication by targeting the epigenetic control of nuclear cccDNA minichromosome with epigenetic small molecules. *Hepatology.* 2012;56:369A.
575. Wooddell CI, Rozema DB, Hossbach M, John M, Hamilton HL, Chu Q, et al. Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Mol Ther.* 2013;21(5):973–85.
576. Volz T, Allweiss L, M'Barek M Ben, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, et al. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J Hepatol.* 2013;58(5):861–7.
577. Nkongolo S, Ni Y, Lempp F a, Kaufman C, Lindner T, Esser-Nobis K, et al. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol.* 2014;60(4):723–31.
578. Lucifora J, Esser K, Protzer U. Ezetimibe blocks hepatitis B virus infection after virus uptake into hepatocytes. *Antiviral Res.* 2013;97(2):195–7.
579. Durantel D, Alotte C, Zoulim F. Glucosidase inhibitors as antiviral agents for hepatitis B and C. *Curr Opin Investig Drugs.* 2007;8(2):125–9.
580. Yu W, Goddard C, Clearfield E, Mills C, Xiao T, Guo H, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of triazolo-pyrimidine derivatives as novel inhibitors of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) secretion. *J Med Chem.* 2011;54(16):5660–70.
581. Xu Y-B, Yang L, Wang G-F, Tong X-K, Wang Y-J, Yu Y, et al. Benzimidazole derivative, BM601, a novel inhibitor of hepatitis B virus and HBsAg secretion. *Antiviral Res.* 2014;107:6–15.
582. Mahtab M, Bazinet M, Vaillant A. REP 9 AC: a potent HBsAg release inhibitor that elicits durable immunological control of chronic HBV infection. *Hepatology.* 2011;54:478A.
583. Fosdick A, Zheng J, Pflanz S, Frey CR, Hesselgesser J, Halcomb RL, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of GS-9620, a novel Toll-like receptor 7 agonist, demonstrate interferon-stimulated gene induction without detectable serum interferon at low oral doses. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;348(1):96–105.
584. Rasi G, Mutchnick MG, Di Virgilio D, Sinibaldi-Vallebona P, Pierimarchi P, Colella F, et al. Combination low-dose lymphoblastoid interferon and thymosin alpha 1 therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 1996;3(4):191–6.
585. Korba BE, Montero AB, Farrar K, Gaye K, Mukerjee S, Ayers MS, et al. Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. *Antiviral Res.* 2008;77(1):56–63.

586. Kapoor R, Kottlilil S. Strategies to eliminate HBV infection. *Future Virol.* 2014;9(6):565–85.
587. Gaggar A, Coeshott C, Apelian D, Rodell T, Armstrong BR, Shen G, et al. Safety, tolerability and immunogenicity of GS-4774, a hepatitis B virus-specific therapeutic vaccine, in healthy subjects: a randomized study. *Vaccine.* 2014;32(39):4925–31.
588. Godon O, Fontaine H, Kahi S, Meritet J, Scott-Algara D, Pol S, et al. Immunological and antiviral responses after therapeutic DNA immunization in chronic hepatitis B patients efficiently treated by analogues. *Mol Ther.* 2014;22(3):675–84.
589. Fontaine H, Kahi S, Chazallon C, Bourguine 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.* 2014;64(1):139–47.
590. Margeridon-Thermet S, Shulman NS, Ahmed A, Shahriar R, Liu TF, Wang C, et al. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naive patients. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1275–85.
591. Solmone M, Vincenti D, Prosperi MCF, Bruselles A, Ippolito G, Capobianchi MR. Use of massively parallel ultradeep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naive patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *J Virol. Am Soc Microbiol;* 2009;83(4):1718–26.
592. Homs M, Buti M, Quer J, Jardí R, Schaper M, Tabernero D, et al. Ultra-deep pyrosequencing analysis of the hepatitis B virus preCore region and main catalytic motif of the viral polymerase in the same viral genome. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(19):8457–71.
593. Ko S-YY, Oh H-BB, Park C-WW, Lee HC, Lee J-EE. Analysis of hepatitis B virus drug-resistant mutant haplotypes by ultra-deep pyrosequencing. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(10):E404–11.
594. Wong DK-HH, Yuen M-FF, Ngai VW-SS, Fung J, Lai C-LL. One-year entecavir or lamivudine therapy results in reduction of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA levels. *Antivir Ther.* 2006;11(7):909–16.
595. Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases CMA. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B (2010 version). *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2011;19(1):13–24.
596. Sloan RD, Ijaz S, Moore PL, Harrison TJ, Teo C, Tedder RS. Antiviral resistance mutations potentiate hepatitis B virus immune evasion through disruption of its surface antigen a determinant. *Antivir Ther.* 2008;13(3):439–47.
597. Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(1):142–63.
598. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(7):887–900.

599. Honorati MC, Dolzani P, Mariani E, Piacentini A, Lisignoli G, Ferrari C, et al. Epitope specificity of Th0/Th2 CD4+ T-lymphocyte clones induced by vaccination with rHBsAg vaccine. *Gastroenterology*. 1997;112(6):2017–27.
600. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res*. 2007;17(8):1195–201.
601. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2012.
602. Campbell PJ, Pleasance ED, Stephens PJ, Dicks E, Rance R, Goodhead I, et al. Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Acad Sciences; 2008;105(35):13081–6.
603. Technologies A. PfuTurbo DNA Polymerase Instruction Manual [Internet]. [cited 2015 Aug 22]. Available from: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/600250.pdf>
604. Rodríguez-Frias F, Jardi R, Schaper M, Buti M, Ferrer-Costa C, Tabernero D, et al. Adefovir for chronic hepatitis B treatment: identification of virological markers linked to therapy response. *Antivir Ther*. 2008;13(8):991–9.
605. Tuske S, Sarafianos SG, Clark AD, Ding J, Naeger LK, White KL, et al. Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11(5):469–74.
606. Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, et al. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology*. 1996;24(3):711–3.
607. Xiong X, Yang H, Westland C, Zou R, Gibbs CS. In vitro evaluation of hepatitis B virus polymerase mutations associated with famciclovir resistance. *Hepatology*. 2000;31(1):219–24.
608. Rhee S-YY, Margeridon-Thermet S, Liu TF, Nguyen MH, Kagan RM, Beggel B, et al. Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase Sequence Variant Database For Sequence Analysis And Mutation Discovery. *Antiviral Res*. Elsevier B.V.; 2010;88(3):269–75.
609. Levine S, Hernandez D, Yamanaka G, Zhang S, Rose R, Weinheimer S, et al. Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2525–32.
610. Boyd K, Kimbell B, Murray S, Iredale J. Living and dying well with end-stage liver disease: time for palliative care? *Hepatology*. 2012;55(6):1650–1.
611. Grellier L, Mutimer D, Ahmed M, Brown D, Burroughs AK, Rolles K, et al. Lamivudine prophylaxis against reinfection in liver transplantation for hepatitis B cirrhosis. *Lancet* (London, England). 1996;348(9036):1212–5.
612. Samuel D. Management of hepatitis B in liver transplantation patients. *Semin Liver Dis*. 2004;24 Suppl 1:55–62.

613. Fung J, Cheung C, Chan S-C, Yuen M-F, Chok KSH, Sharr W, et al. Entecavir monotherapy is effective in suppressing hepatitis B virus after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1212–9.
614. Perrillo R, Buti M, Durand F, Charlton M, Gadano A, Cantisani G, et al. Entecavir and hepatitis B immune globulin in patients undergoing liver transplantation for chronic hepatitis B. *Liver Transpl*. 2013;19(8):887–95.
615. Buti M, Mas A, Prieto M, Casafont F, González A, Miras M, et al. A randomized study comparing lamivudine monotherapy after a short course of hepatitis B immune globulin (HBIg) and lamivudine with long-term lamivudine plus HBIg in the prevention of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *J Hepatol*. 2003;38(6):811–7.
616. Buti M, Mas A, Prieto M, Casafont F, González A, Miras M, et al. Adherence to Lamivudine after an early withdrawal of hepatitis B immune globulin plays an important role in the long-term prevention of hepatitis B virus recurrence. *Transplantation*. 2007;84(5):650–4.
617. Ferguson M, Health A, Bar P, Lelie N, Nübling M, Nick S, et al. Report of a collaborative study to 1) assess the suitability of a candidate replacement International Standard for HBsAg and a reference panel for HBsAg and 2) to calibrate the candidate standard in IU. Geneva; 2003.
618. Quer J, Gregori J, Rodríguez-Frías F, Buti M, Madejon A, Perez-del-Pulgar S, et al. High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. *J Clin Microbiol*. 2015;53(1):219–26.
619. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80.
620. Pages H, Aboyoun P, Gentleman R, DebRoy S. Biostrings: String objects representing biological sequences, and matching algorithms. R package version 2.13.2. 2011.
621. Technologies A. PfuUltra II DNA Polymerases & PCR Master Mixes - Details & Specifications [Internet]. [cited 2015 Aug 22]. Available from: <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?crumbAction=push&pageId=1096>
622. Feliu A, Gay E, García-Retortillo M, Saiz JC, Forns X. Evolution of hepatitis C virus quasispecies immediately following liver transplantation. *Liver Transpl*. 2004;10(9):1131–9.
623. Reuman EC, Margeridon-Thermet S, Caudill HB, Liu TF, Borroto-Esoda K, Svarovskaia ES, et al. A classification model for G-to-A hypermutation in hepatitis B virus ultra-deep pyrosequencing reads. *Bioinformatics*. 2010;26(23):2929–32.
624. Homs M, Caballero A, Gregori J, Taberner D, Quer J, Nieto L, et al. Clinical Application of Estimating Hepatitis B Virus Quasispecies Complexity by Massive Sequencing: Correlation between Natural Evolution and On-Treatment Evolution. *PLoS One*. 2014;9(11):e112306.
625. Liaw Y-F, Kao J-H, Piratvisuth T, Chan HLY, Chien R-N, Liu C-J, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update. *Hepatol Int*. 2012;6(3):531–61.

626. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology*. 2009;50(3):661–2.
627. Rodríguez-Frías F, Tabernero D, Esteban R, Buti M. Study of hepatitis B virus quasispecies by ultra-deep pyrosequencing: Resolving the nitty-gritty. *Hepatology*. 2013;1–6.
628. Westgard JO, Bawa N, Ross JW, Lawson NS. Laboratory precision performance: state of the art versus operating specifications that assure the analytical quality required by clinical laboratory improvement amendments proficiency testing. *Arch Pathol Lab Med*. 1996;120(7):621–5.
629. Westgard JO, Seehafer JJ, Barry PL. European specifications for imprecision and inaccuracy compared with operating specifications that assure the quality required by US CLIA proficiency-testing criteria. *Clin Chem*. 1994;40(7 Pt 1):1228–32.
630. Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, Akyuz F, Pinarbasi B, Abaci N, et al. Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Elsevier Inc.; 2014;79(1):25–30.
631. Görzer I, Guelly C, Trajanoski S, Puchhammer-Stöckl E. The impact of PCR-generated recombination on diversity estimation of mixed viral populations by deep sequencing. *J Virol Methods*. 2010;169(1):248–52.
632. Chen CY. DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: Both past and present. *Front Microbiol*. 2014;5(JUN):1–11.
633. Kanagawa T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng*. 2003;96(4):317–23.
634. Wang Y-W, Shan X, Huang Y, Deng H, Huang W-X, Zhang D-Z, et al. A novel baseline hepatitis B virus sequencing-based strategy for predicting adefovir antiviral response. *Infect Genet Evol*. Elsevier B.V.; 2015;33:269–76.
635. Han Y, Gong L, Sheng J, Liu F, Li X-H, Chen L, et al. Prediction of virological response by pretreatment hepatitis B virus reverse transcriptase quasispecies heterogeneity: the advantage of using next-generation sequencing. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(8):797.e1–8.
636. Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekulé a S. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol*. 1992;66(9):5284–9.
637. Kekulé a S, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature*. 1990;343(6257):457–61.
638. Rodriguez C, Chevaliez S, Bensadoun P, Pawlotsky J-M. Characterization of the dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir by ultra-deep pyrosequencing. *Hepatology*. 2013;1–12.

639. Yang H, Westland C, Delaney IV WE, Heathcote EJ, Ho V, Fry J, et al. Resistance surveillance in chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil for up to 60 weeks. *Hepatology*. 2002;36(2):464–73.
640. Buti M, Casillas R, Riveiro-Barciela M, Homs M, Tabernero D, Salcedo MT, et al. Tenofovir discontinuation after long-term viral suppression in HBeAg negative chronic hepatitis B. Can HBsAg levels be useful? *J Clin Virol*. Elsevier B.V.; 2015;68:61–8.
641. Zhang Y. What is FASTA format? [Internet]. 2014 [cited 2015 Aug 27]. Available from: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/FASTA/>